

4/5/2

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI

(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

009565129

WPI Acc No: 1993-258677/199332

XRAM Acc No: C93-114920

New therapeutically active fusion proteins - comprising active polypeptide linked to albumin (variant)

Patent Assignee: RHONE POULENC RORER SA (RHON); FLEER R (FLEE-I);

FOURNIER A (FOUR-I); GUITTON J (GUIT-I); JUNG G (JUNG-I); YEH P (YEHP-I)

Inventor: FLEER R; FOURNIER A; GUITTON J; JUNG G; YEH P

Number of Countries: 022 Number of Patents: 007

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
WO 9315199	A1	19930805	WO 93FR85	A	19930128	199332 B
FR 2686899	A1	19930806	FR 921064	A	19920131	199344
FI 9403563	A	19940729	WO 93FR85	A	19930128	199437
			FI 943563	A	19940729	
NO 9402839	A	19940922	WO 93FR85	A	19930128	199442
			NO 942839	A	19940729	
EP 624195	A1	19941117	EP 93904129	A	19930128	199444
			WO 93FR85	A	19930128	
JP 7503368	W	19950413	JP 93512986	A	19930128	199523
			WO 93FR85	A	19930128	
US 5876969	A	19990302	WO 93FR85	A	19930128	199916
			US 94256927	A	19940728	
			US 97797689	A	19970131	

Priority Applications (No Type Date): FR 921064 A 19920131

Cited Patents: 1.Jnl.Ref; EP 413622; JP 3201987; WO 8902922; WO 9013653; WO 9300437

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
WO 9315199	A1	67	C12N-015/12	
				Designated States (National): CA FI JP NO US
				Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE
FR 2686899	A1	35	C12P-021/02	
EP 624195	A1 F		C12N-015/12	Based on patent WO 9315199
				Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU NL PT SE
JP 7503368	W		C12N-015/09	Based on patent WO 9315199
US 5876969	A		C07K-014/00	Cont of application WO 93FR85
				Cont of application US 94256927
FI 9403563	A		C12N-000/00	
NO 9402839	A		C12N-015/62	

Abstract (Basic): WO 9315199 A

New recombinant polypeptides (I) comprise an active portion derived from a therapeutically active polypeptide (II), genetically coupled to an albumin or albumin variant.

Also claimed are: (1) a nucleotide sequence coding for (I); (2) an expression cassette comprising a sequence (1) under the control of a transcription initiation region and opt. a transcription termination region; (3) a self-replicating plasmid contg. a cassette (2); and (4) a recombinant eukaryotic or prokaryotic cell contg. a sequence (1),

BEST AVAILABLE COPY

cassette (2) or plasmid (3).

USE/ADVANTAGE - (I) are plasma-stable forms of (II) and may be used for the same therapeutic purposes. They may have enhanced activity and/or reduced side effects. The nucleotide sequence may also be used for gene therapy

Dwg.0/18

Title Terms: NEW; THERAPEUTIC; ACTIVE; FUSE; PROTEIN; COMPRISE; ACTIVE; POLYPEPTIDE; LINK; ALBUMIN; VARIANT

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C07K-014/00; C12N-000/00; C12N-015/09; C12N-015/12; C12N-015/62; C12P-021/02

International Patent Class (Additional): A61K-037/02; A61K-038/16; A61K-038/21; C07K-013/00; C12N-001/19; C12N-001/21; C12N-005/10; C12N-015/14; C12N-015/81; C12R-001-85

File Segment: CPI

PCT

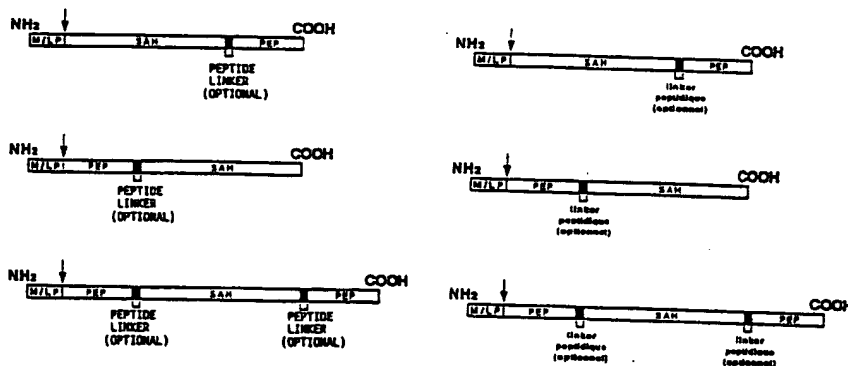
ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets 5 : C12N 15/12, 15/62, 15/81 C12P 21/02, C07K 13/00 A61K 37/02, C12N 1/19 // (C12N 1/19, C12R 1:85)</p>	A1	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 93/15199</p> <p>(43) Date de publication internationale: 5 août 1993 (05.08.93)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00085</p> <p>(22) Date de dépôt international: 28 janvier 1993 (28.01.93)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 92/01064 31 janvier 1992 (31.01.92) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. (FR/FR); 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): FLEER, Reinhard (DE/FR); 47, avenue Beauséjour, F-91440 Bures-sur-Yvette (FR). FOURNIER, Alain (FR/FR); 28, avenue Roger-Salengro, F-92000 Châtenay-Malabry (FR). GUITTON, Jean-Dominique (FR/FR); 74, rue Dunois, F-75013 Paris (FR). JUNG, Gérard (FR/FR); 12, rue des Grands-Jardins, Leuville-sur-Orge, F-91310 Montlhéry (FR). YEH, Patrice (FR/FR); 11 bis, rue Lacépède, F-75005 Paris (FR).</p>		<p>(74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).</p> <p>(81) Etats désignés: CA, FI, JP, NO, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</p>

(54) Title: NOVEL BIOLOGICALLY ACTIVE POLYPEPTIDES, PREPARATION THEREOF AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING SAID POLYPEPTIDES

(54) Titre: NOUVEAUX POLYPEPTIDES BIOLOGIQUEMENT ACTIFS, LEUR PREPARATION ET COMPOSITION PHARMACEUTIQUE LES CONTENANT



(57) Abstract

Novel biologically active polypeptides, preparation thereof and pharmaceutical compositions containing said polypeptides.

(57) Abrégé

La présente invention concerne de nouveaux polypeptides biologiquement actifs, leur préparation et des compositions pharmaceutiques les contenant.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	GN	Guinée	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	PL	Pologne
BJ	Bénin	IE	Irlande	PT	Portugal
BR	Brazil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SK	République slovaque
CI	Côte d'Ivoire	LJ	Liechtenstein	SN	Sénégal
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Allemagne	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DK	Danemark	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
ES	Espagne	MN	Mongolie	VN	Viet Nam
FI	Finlande				

NOUVEAUX POLYPEPTIDES BIOLOGIQUEMENT ACTIFS.
LEUR PREPARATION ET COMPOSITION PHARMACEUTIQUE LES
CONTENANT

La présente invention concerne de nouveaux polypeptides biologiquement
5 actifs, leur préparation et des compositions pharmaceutiques les contenant.

Plus particulièrement, la présente invention concerne des polypeptides
recombinants essentiellement composés d'une partie active dérivée d'un polypeptide,
naturel ou artificiel, ayant une activité thérapeutique, et couplé à une albumine ou à
un variant de l'albumine. Il est entendu que l'activité thérapeutique des polypeptides
10 de l'invention peut être soit directe (traitement des maladies), ou indirecte (et par
exemple utilisable dans la prévention des maladies, dans la conception des vaccins,
dans les techniques de l'imagerie médicale etc...).

Il est entendu dans ce qui suit que les variants de l'albumine désignent toute
protéine à haute demie-vie plasmatique obtenue par modification (mutation, délétion
15 et/ou addition) par les techniques du génie génétique d'un gène codant pour un
isomorphe donné de la sérum-albumine humaine, ainsi que toute macromolécule à
haute demie-vie plasmatique obtenue par modification *in vitro* de la protéine codée
par de tels gènes. L'albumine étant très polymorphe, de nombreux variants naturels
ont été identifiés et répertoriés [Weitkamp L.R. et al., Ann. Hum. Genet. 37 (1973)
20 219].

Le but de la présente invention est d'élaborer des protéines artificielles
biologiquement actives et utilisables sur le plan pharmaceutique. En effet, de
nombreux polypeptides possédant une ou plusieurs activités thérapeutiques
potentielles ne peuvent être exploités pharmaceutiquement. Ceci peut avoir
25 différentes raisons, telles que notamment leur faible stabilité *in vivo*, leur structure
complexe ou fragile, la difficulté de les produire à une échelle industriellement
acceptable, etc... De même, certains polypeptides ne donnent pas les résultats
attendus *in vivo* en raison de problèmes d'administration, de conditionnement, de
pharmacocinétique etc...

30 La présente invention permet de remédier à ces inconvénients. La présente
invention fournit en effet de nouvelles molécules permettant une exploitation
optimale sur le plan thérapeutique des propriétés biologiques de ces polypeptides. La

présente invention résulte notamment de la mise en évidence qu'il est possible de coupler génétiquement toute structure active dérivée d'un polypeptide biologiquement actif à une autre structure protéique constituée d'albumine, sans en altérer lesdites propriétés biologiques. Elle résulte également de la mise en évidence par la demanderesse que la sérum-albumine humaine permet de présenter efficacement la structure active à ses sites d'interaction, et qu'elle assure une stabilité plasmatique élevée du polypeptide de l'invention. Les polypeptides de l'invention permettent ainsi de maintenir dans l'organisme une activité biologique donnée pendant un temps prolongé. Ils permettent ainsi de réduire les doses administrées et, dans certains cas, de potentialiser l'effet thérapeutique, par exemple en réduisant les effets secondaires consécutifs à une administration plus importante. Les polypeptides de l'invention permettent de plus de générer et d'utiliser des structures dérivées des polypeptides biologiquement actifs très petites et donc très spécifiques d'un effet recherché. Il est entendu que les peptides ayant une activité biologique présentant un intérêt thérapeutique peuvent également correspondre à des séquences peptidiques non naturelles, isolées par exemple à partir de banques peptidiques aléatoires. Les polypeptides de l'invention possèdent par ailleurs une répartition particulièrement avantageuse dans l'organisme, ce qui modifie leurs propriétés pharmacocinétiques et favorise le développement de leur activité biologique et leur utilisation. En outre, ils présentent également l'avantage d'être faiblement ou non-immunogéniques pour l'organisme dans lequel ils sont utilisés. Finalement, les polypeptides de l'invention peuvent être exprimés (et préférentiellement sécrétés) par des organismes recombinants, à des niveaux permettant leurs exploitation industrielle.

Un objet de la présente invention concerne donc des polypeptides comportant une partie active dérivée d'un polypeptide ayant une activité thérapeutique, couplée à une albumine ou à un variant de l'albumine.

Dans un mode de réalisation particulier, les peptides possédant une activité thérapeutique ne sont pas d'origine humaine. Par exemple on peut citer des peptides, ou leurs dérivés, possédant des propriétés potentiellement utiles dans les pathologies des compartiments sanguins et interstitiels, tels que l'hirudine, la trigramine, l'antistatine, les peptides anticoagulant des tiques (TAP), l'ariétine, l'aplagine etc....

Plus particulièrement, dans les molécules de l'invention, le polypeptide ayant une activité thérapeutique est un polypeptide d'origine humaine ou un variant moléculaire. Par exemple, il peut s'agir de tout ou partie, d'un enzyme, d'un inhibiteur d'enzyme, d'un antigène, d'un anticorps, d'une hormone, d'un facteur intervenant dans le contrôle de la coagulation, d'un interféron, d'une cytokine [les interleukines, mais aussi leurs variants antagonistes naturels de leur fixation au(x) récepteur(s), les cytokines de type SIS (small induced secreted) et par exemple les protéines inflammatoires des macrophages (les MIPs), etc...], d'un facteur de croissance et/ou de différenciation [et par exemple les facteurs de croissance transformants (les TGFs), les facteurs de différenciation des cellules sanguines (érythropoïétine, M-CSF, G-CSF, GM-CSF etc...), l'insuline et les facteurs de croissance qui lui ressemblent (les IGFs), ou encore les facteurs de perméabilité cellulaire (VPF/VEGF), etc...], d'un facteur impliqué dans la génèse/résorption des tissus osseux (OIF et ostéopontine par exemple), d'un facteur impliqué dans la motilité ou la migration cellulaire [et par exemple le facteur de motilité autocrine (AMF), le facteur de stimulation de la migration (MSF), ou encore le facteur de dispersion (scatter factor/facteur de croissance des hépatocytes)], d'un facteur bactéricide ou antifongique, d'un facteur chimiotactique [et par exemple le facteur plaquettaire 4 (PF4), ou encore les peptides chemoattractants des monocytes (MCP/MCAF) ou des neutrophiles (NCAF), etc...], d'un facteur cytotatique (et par exemple les protéines qui se fixent aux galactosides), d'une molécule adhésive plasmatique (et par exemple le facteur de von Willebrand, le fibrinogène etc...) ou interstitielle (laminine, ténascine, vitronectine, etc...) ou des matrices extracellulaires, ou encore toute séquence peptidique antagoniste ou agoniste d'interactions moléculaires et/ou intercellulaires impliquées dans les pathologies des compartiments circulatoires et interstitiels et par exemple la formation des thrombus artériels et veineux, les métastases cancéreuses, l'angiogénèse tumorale, le choc inflammatoire, les maladies autoimmunes, les pathologies osseuses et ostéo-articulaires etc...

La partie active des polypeptides de l'invention peut être constituée, par exemple, par le polypeptide ayant une activité thérapeutique entier, ou par une structure dérivée de celui-ci, ou encore par un polypeptide non naturel isolé à partir d'une banque peptidique. Au sens de la présente invention, on entend par structure dérivée tout polypeptide obtenu par modification et conservant une activité

thérapeutique. Par modification, on doit entendre toute mutation, substitution, délétion, addition ou modification de nature génétique et/ou chimique. De tels dérivés peuvent être générés dans des buts différents, tels que notamment celui d'augmenter l'affinité de la molécule pour ses sites de fixation, celui d'améliorer ses
5 niveaux de production, celui d'augmenter sa résistances aux protéases, celui d'augmenter son efficacité thérapeutique ou encore de réduire ses effets secondaires, ou celui de lui conférer de nouvelles propriétés biologiques. A titre d'exemple, les polypeptides chimères de l'invention possèdent des propriétés pharmacocinétiques et une activité biologique utilisable pour la prévention ou le traitement des maladies.

10 Des polypeptides de l'invention particulièrement avantageux sont ceux dans lesquels la partie active présente :

(a) la structure peptidique entière ou,

(b) une structure dérivée de (a) par modification structurale (mutation, substitution addition et/ou délétion d'un ou plusieurs résidus) et possédant une
15 activité thérapeutique.

Parmi les structures du type (b), on peut citer plus particulièrement les molécules dans lesquelles certains sites de N- ou O-glycosylation ont été modifiés ou supprimés, les molécules dans lesquelles un ou plusieurs résidus ont été substitués, ou les molécules dans lesquelles tous les résidus cystéine ont été substitués. On peut
20 citer également des molécules obtenues à partir de (a) par délétion de régions n'intervenant pas ou peu dans l'interaction avec les sites de liaison considérés, ou exprimant une activité indésirable, et des molécules comportant par rapport à (a) des résidus supplémentaires, tels que par exemple une méthionine N-terminale et/ou un signal de sécrétion et/ou un peptide de jonction.

25 La partie active des molécules de l'invention peut être couplée soit directement soit par l'intermédiaire d'un peptide artificiel à l'albumine. De plus, elle peut constituer l'extrémité N-terminale comme l'extrémité C-terminale de la molécule. Préférentiellement, dans les molécules de l'invention, la partie active constitue la partie C-terminale de la chimère. Il est également entendu que la partie
30 biologiquement active peut être redondante au sein de la chimère. Une représentation schématique des molécules de l'invention est donnée à la Figure 1.

Un autre objet de l'invention concerne un procédé de préparation des molécules chimères décrites ci-avant. Plus précisément, ce procédé consiste à faire exprimer par un hôte cellulaire eucaryote ou procaryote une séquence nucléotidique codant pour le polypeptide désiré, puis à récolter le polypeptide produit.

5 Parmi les hôtes eucaryotes utilisables dans le cadre de la présente invention, on peut citer les cellules animales, les levures, ou les champignons. En particulier, s'agissant de levures, on peut citer les levures du genre Saccharomyces, Kluyveromyces, Pichia, Schwanniomyces, ou Hansenula. S'agissant de cellules animales, on peut citer les cellules COS, CHO, C127, etc... Parmi les champignons
10 susceptibles d'être utilisés dans la présente invention, on peut citer plus particulièrement Aspergillus ssp. ou Trichoderma ssp. Comme hôtes procaryotes, on préfère utiliser les bactéries telles que Escherichia coli, ou appartenant aux genres Corynebacterium, Bacillus, ou Streptomyces.

Les séquences nucléotidiques utilisables dans le cadre de la présente
15 invention peuvent être préparées de différentes manières. Généralement, elles sont obtenues en assemblant en phase de lecture les séquences codant pour chacune des parties fonctionnelles du polypeptide. Celles-ci peuvent être isolées par les techniques de l'homme de l'art, et par exemple directement à partir des ARN messagers (ARNm) cellulaires, ou par reclonage à partir d'une banque d'ADN
20 complémentaire (ADNc), ou encore il peut s'agir de séquences nucléotidiques totalement synthétiques. Il est entendu de plus que les séquences nucléotidiques peuvent également être ultérieurement modifiées, par exemple par les techniques du génie génétique, pour obtenir des dérivés ou des variants desdites séquences.

Plus préférentiellement, dans le procédé de l'invention, la séquence
25 nucléotidique fait partie d'une cassette d'expression comprenant une région d'initiation de la transcription (région promoteur) permettant, dans les cellules hôtes, l'expression de la séquence nucléotidique placée sous son contrôle et codant pour les polypeptides de l'invention. Cette région peut provenir de régions promoteurs de gènes fortement exprimés dans la cellule hôte utilisée, l'expression étant constitutive
30 ou régulable. S'agissant de levures, il peut s'agir du promoteur du gène de la phosphoglycérate kinase (PGK), de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GPD), de la lactase (LAC4), des énoïases (ENO), des alcools deshydrogénases (ADH), etc... S'agissant de bactéries, il peut s'agir du promoteur des gènes droit ou gauche du bactériophage lambda (PL, PR), ou encore des promoteurs des gènes des

opérons tryptophane (P_{trp}) ou lactose (P_{lac}). En outre, cette région de contrôle peut être modifiée, par exemple par mutagenèse *in vitro*, par introduction d'éléments additionnels de contrôle ou de séquences synthétiques, ou par des délétions ou des substitutions des éléments originels de contrôle. La cassette d'expression peut également comprendre une région de terminaison de la transcription fonctionnelle dans l'hôte envisagé, positionnée immédiatement en aval de la séquence nucléotidique codant pour un polypeptide de l'invention.

Dans un mode préféré, les polypeptides de l'invention résultent de l'expression dans un hôte eucaryote ou procaryote d'une séquence nucléotidique et de la sécrétion du produit d'expression de ladite séquence dans le milieu de culture. Il est en effet particulièrement avantageux de pouvoir obtenir par voie recombinante des molécules directement dans le milieu de culture. Dans ce cas, la séquence nucléotidique codant pour un polypeptide de l'invention est précédée d'une séquence "leader" (ou séquence signal) dirigeant le polypeptide naissant dans les voies de sécrétion de l'hôte utilisé. Cette séquence "leader" peut être la séquence signal naturelle du polypeptide biologiquement actif dans le cas où celui-ci est une protéine naturellement sécrétée, ou celle de la structure stabilisatrice, mais il peut également s'agir de toute autre séquence "leader" fonctionnelle, ou d'une séquence "leader" artificielle. Le choix de l'une ou l'autre de ces séquences est notamment guidé par l'hôte utilisé. Des exemples de séquences signal fonctionnelles incluent celles des gènes des phéromones sexuelles ou des toxines "killer" de levures.

En plus de la cassette d'expression, un ou plusieurs marqueurs permettant de sélectionner l'hôte recombiné peuvent être additionnés, tels que par exemple le gène URA3 de la levure *S. cerevisiae*, ou des gènes conférant la résistance à des antibiotiques comme la généticine (G418) ou à tout autre composé toxique comme certains ions métalliques.

L'ensemble constitué par la cassette d'expression et par le marqueur de sélection peut être introduit directement dans les cellules hôtes considérées, soit inséré préalablement dans un vecteur autorépliatif fonctionnel. Dans le premier cas, des séquences homologues à des régions présentes dans le génôme des cellules hôtes sont préférentiellement additionnées à cet ensemble; lesdites séquences étant alors positionnées de chaque côté de la cassette d'expression et du gène de sélection de façon à augmenter la fréquence d'intégration de l'ensemble dans le génôme de l'hôte

en ciblant l'intégration des séquences par recombinaison homologue. Dans le cas où la cassette d'expression est insérée dans un système réplcatif, un système de réplcation préféré pour les levures du genre Kluyveromyces est dérivé du plasmide pKD1 initialement isolé de K.drosophilanum; un système préféré de réplcation pour les levures du genre Saccharomyces est dérivé du plasmide 2 μ de S. cerevisiae. De plus, ce plasmide d'expression peut contenir tout ou partie desdits systèmes de réplcation, ou peut combiner des éléments dérivés du plasmide pKD1 aussi bien que du plasmide 2 μ .

En outre, les plasmides d'expression peuvent être des vecteurs navettes entre un hôte bactérien tel que Escherichia coli et la cellule hôte choisie. Dans ce cas, une origine de réplcation et un marqueur de sélection fonctionnant dans l'hôte bactérien sont requises. Il est également possible de positionner des sites de restriction entourant les séquences bactériennes et uniques sur le vecteur d'expression: ceci permet de supprimer ces séquences par coupure et religature in vitro du vecteur tronqué avant transformation des cellules hôtes, ce qui peut résulter en une augmentation du nombre de copies et en une stabilité accrue des plasmides d'expression dans lesdits hôtes. Par exemple, de tels sites de restriction peuvent correspondre aux séquences telles que 5'-GGCCNNNNNGGCC-3' (SfiI) ou 5'-GCGGCCGC-3' (NotI) dans la mesure où ces sites sont extrêmement rares et généralement absents d'un vecteur d'expression.

Après construction de tels vecteurs ou cassette d'expression, ceux-ci sont introduits dans les cellules hôtes retenues selon les techniques classiques décrites dans la littérature. A cet égard, toute méthode permettant d'introduire un ADN étranger dans une cellule peut être utilisée. Il peut s'agir notamment de transformation, électroporation, conjugaison, ou toute autre technique connue de l'homme de l'art. A titre d'exemple pour les hôtes de type levure, les différentes souches de Kluyveromyces utilisées ont été transformées en traitant les cellules entières en présence d'acétate de lithium et de polyéthylène glycol, selon la technique décrite par Ito et al. [J. Bacteriol. **153** (1983) 163]. La technique de transformation décrite par Durrens et al. [Curr. Genet. **18** (1990) 7] utilisant l'éthylène glycol et le diméthylsulfoxyde a également été utilisée. Il est aussi possible de transformer les levures par électroporation, selon la méthode décrite par Karube et al. [FEBS Letters **182** (1985) 90]. Un protocole alternatif est également décrit en détail dans les exemples qui suivent.

Après sélection des cellules transformées, les cellules exprimant lesdits polypeptides sont inoculées et la récupération desdits polypeptides peut être faite, soit au cours de la croissance cellulaire pour les procédés "en continu", soit en fin de croissance pour les cultures "en lots" ("batch"). Les polypeptides qui font l'objet de la présente invention sont ensuite purifiés à partir du surnageant de culture en vue de leur caractérisation moléculaire, pharmacocinétique et biologique.

Un système d'expression préféré des polypeptides de l'invention consiste en l'utilisation des levures du genre Kluyveromyces comme cellule hôte, transformées par certains vecteurs dérivés du réplicon extrachromosomique pKD1 initialement isolé chez K. marxianus var. drosophilae. Ces levures, et en particulier K. lactis et K. fragilis sont généralement capables de répliquer lesdits vecteurs de façon stable et possèdent en outre l'avantage d'être incluses dans la liste des organismes G.R.A.S. ("Generally Recognized As Safe"). Des levures privilégiées sont préférentiellement des souches industrielles du genre Kluyveromyces capables de répliquer de façon stable lesdits plasmides dérivés du plasmide pKD1 et dans lesquels a été inséré un marqueur de sélection ainsi qu'une cassette d'expression permettant la sécrétion à des niveaux élevés des polypeptides de l'invention.

La présente invention concerne également les séquences nucléotidiques codant pour les polypeptides chimères décrits ci-avant, ainsi que les cellules recombinantes, eucaryotes ou procaryotes, comprenant de telles séquences.

La présente invention concerne aussi l'application à titre de médicament des polypeptides selon la présente invention. Plus particulièrement, l'invention a pour objet toute composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs polypeptides ou séquences nucléotidiques tels que décrits ci-avant. Les séquences nucléotidiques peuvent en effet être utilisées en thérapie génique.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

LISTE DES FIGURES

Les représentations des plasmides indiquées dans les Figures suivantes ne sont pas tracées à l'échelle et seuls les sites de restriction importants pour la compréhension des clonages réalisés ont été indiqués.

- 5 **Figure 1 :** Schématisation des chimères du type SAH-PEPTIDE (A), du type PEPTIDE-SAH (B) ou PEPTIDE-SAH-PEPTIDE (C). Abréviations utilisées : M/LP, résidu méthionine initiateur de la traduction, éventuellement suivie d'une séquence signal de sécrétion; SAH, albumine mature ou un de ses variants moléculaires; PEP, peptide d'origine naturelle ou artificielle possédant une propriété thérapeutique donnée. La séquence PEP peut être présente plusieurs fois dans les
- 10 molécules de type A, B ou C. La flèche noire indique l'extrémité N-terminale de la protéine mature.

- Figure 2 :** Exemples de séquences nucléotidiques d'un fragment de restriction HindIII codant pour une protéine chimère du type prépro-SAH-PEPTIDE.
- 15 Les flèches noires indiquent la fin des régions "pré" et "pro" de la SAH. Le site de restriction MstII est souligné et le codon spécifiant la terminaison de la traduction est en caractères gras.

- Figure 3 :** Carte de restriction du plasmide pYG105 et stratégie générique de construction des plasmides d'expression des protéines chimères de la
- 20 présente invention. Abréviations utilisées : P, promoteur transcriptionnel ; T, terminateur transcriptionnel ; IR, séquences répétées inversées du plasmide pKD1 ; LP, séquence signal de sécrétion ; Ap^r et Km^r désignent respectivement les gènes de résistance à l'ampicilline (E. coli) et au G418 (levures).

- Figure 4 :** Exemples de séquences nucléotidiques de fragments de
- 25 restriction MstII-HindIII dérivés du facteur von Willebrand. Représentation de la structure des fragments MstII-HindIII des plasmides pYG1248 (panneau A), pYG1214 (panneau B), pYG1206 [panneau C, dans cette chimère particulière le résidu Leu694 du vWF est également le dernier résidu (Leu585) de la SAH] et pYG1223 (panneau D) ; la numérotation des acides aminés correspond à la
- 30 numérotation du vWF mature d'après Titani et al. [Biochemistry 25 (1986) 3171-3184]. Les sites de restriction MstII et HindIII sont soulignés et le codon de

terminaison de la traduction est en caractères gras. Panneau E : séquence nucléotidique du fragment de restriction MstII-HindIII du plasmide pYG1248. La numérotation des acides aminés (colonne de droite) correspond à la protéine chimère SAH-vWF470->713 mature (829 résidus). Les résidus Thr470, Leu494, Asp498, Pro502, Tyr508, Leu694, Pro704, et Pro708 du vWF mature sont soulignés.

5 **Figure 5 :** Caractérisation du matériel sécrété après 4 jours de culture (erlenmeyers) de la souche CBS 293.91 transformée par les plasmides pYG1248 (plasmide d'expression d'une chimère du type SAH-vWF Thr470->Val713) et pKan707 (plasmide contrôle). Dans cette expérience les résultats des panneaux A, B, et C ont été migrés sur le même gel (SDS-PAGE 8,5 %) puis traités séparément.

10 A, coloration au bleu de coomassie; standard de poids moléculaire (piste 2); surnageant équivalent à 50 µl de la culture transformée par les plasmides pKan707 en milieu YPL (piste 1), ou pYG1248 en milieu YPD (piste 3) ou YPL (piste 4).

B, caractérisation immunologique du matériel sécrété après utilisation d'anticorps de souris dirigés contre le vWF humain: même légende qu'en A à l'exception que des standards biotinilés de poids moléculaire ont été utilisés.

15 C, caractérisation immunologique du matériel sécrété après utilisation d'anticorps de lapin dirigés contre l'albumine humaine: surnageant équivalent à 50 µl de la culture transformée par les plasmides pKan707 en milieu YPL (piste 1), ou pYG1248 en milieu YPD (piste 2) ou YPL (piste 3).

Figure 6 : Cinétique de sécrétion d'une chimère de l'invention par la souche CBS 293.91 transformée par le plasmide pYG1206 (SAH-vWF Leu694-Pro708).

25 A, coloration au bleu de coomassie ; standard de poids moléculaire (piste 1) ; surnageant équivalent à 2,5 µl d'une culture "Fed Batch" en milieu YPD après 24h. (piste 2), 40h. (piste 3) ou 46h. (piste 4) de croissance.

B, caractérisation immunologique du matériel sécrété après utilisation d'anticorps de souris dirigés contre le vWF humain : même légende qu'en A à l'exception que des standards biotinilés de poids moléculaire ont été utilisés.

30 **Figure 7 :** Caractérisation du matériel sécrété par K. lactis transformé par les plasmides pKan707 (plasmide contrôle, piste 2), pYG1206 (piste 3), pYG1214 (piste 4) et pYG1223 (piste 5) ; standard de poids moléculaire (piste 1). Les dépôts correspondent à 50 µl de surnageant d'une culture stationnaire après

croissance en milieu YPD, migration dans un gel à 8.5 % d'acrylamide et coloration au bleu de coomassie.

Figure 8 : Séquence nucléotidique du fragment de restriction MstII-HindIII du plasmide pYG1341 (SAH-UK1->135). La limite du domaine EGF-like (UK1->46) présent dans le fragment de restriction MstII-HindIII du plasmide pYG1340 est indiquée. La numérotation des acides aminés correspond à la protéine chimère SAH-UK1->135 mature (720 résidus).

Figure 9 : Sécrétion des chimères SAH-UK1-46 et SAH-UK1-135 par la souche CBS 293.91 respectivement transformée par les plasmides pYG1343 (SAH-UK1-46) et pYG1345 (SAH-UK1-135), après 4 jours de croissance (milieu YPL+G418). Les dépôts (équivalents à 50 µl de culture) sont migrés en gel PAGE-SDS à 8,5 % et colorés au bleu de coomassie: surnageant d'un clone transformé par les plasmides pKan707 (piste 1), pYG1343 (piste 3) ou pYG1345 (piste 4) ; standard de poids moléculaire (piste 2).

Figure 10 : Séquence nucléotidique du fragment de restriction MstII-HindIII du plasmide pYG1259 (SAH-G.CSF). La limite de la partie G-CSF (174 résidus) est indiquée. Les sites de restriction ApaI et SstI (SacI) sont soulignés. La numérotation des acides aminés correspond à la protéine chimère SAH-G.CSF mature (759 résidus).

Figure 11 : Séquence nucléotidique du fragment de restriction HindIII du plasmide pYG1301 (chimère G.CSF-Gly4-SAH). Les flèches noires indiquent la fin des régions "pré" et "pro" de la SAH. Les sites de restriction ApaI, SstI (SacI) et MstII sont soulignés. Les domaines G.CSF (174 résidus) et SAH (585 résidus) sont séparés par le linker synthétique GGGG. La numérotation des acides aminés correspond à la protéine chimère G.CSF-Gly4-SAH mature (763 résidus). La séquence nucléotidique comprise entre le codon de terminaison de la traduction et le site HindIII provient de l'ADN complémentaire (cDNA) de la SAH tel que décrit dans la demande de brevet EP 361 991.

Figure 12 : Caractérisation du matériel sécrété après 4 jours de culture (erlenmeyers) de la souche CBS 293.91 transformée par les plasmides pYG1266 (plasmide d'expression d'une chimère du type SAH-G.CSF) et pKan707 (plasmide

contrôle). Dans cette expérience les résultats des panneaux A, B, et C ont été migrés sur le même gel (SDS-PAGE 8,5 %) puis traités séparément.

A, coloration au bleu de coomassie; standard de poids moléculaire (piste 2) ; surnageant équivalent à 100 µl de la culture transformée par les plasmides pKan707 en milieu YPL (piste 1), ou pYG1266 en milieu YPD (piste 3) ou YPL (piste 4).

B, caractérisation immunologique du matériel sécrété après utilisation d'anticorps primaires dirigés contre le G-CSF humain : même légende qu'en A.

C, caractérisation immunologique du matériel sécrété après utilisation d'anticorps primaires dirigés contre l'albumine humaine : même légende qu'en A.

10 **Figure 13 :** Caractérisation du matériel sécrété après 4 jours de culture (erlenmeyers en milieu YPD) de la souche CBS 293.91 transformée par les plasmides pYG1267 (chimère SAH-G.CSF), pYG1303 (chimère G.CSF-Gly4-SAH) et pYG1352 (chimère SAH-Gly4-G.CSF) après migration sur gel SDS-PAGE 8,5 %.

A, coloration au bleu de coomassie ; surnageant équivalent à 100 µl de la culture transformée par les plasmides pYG1303 (piste 1), pYG1267 (piste 2) ou pYG1352 (piste 3); standard de poids moléculaire (piste 4).

B, caractérisation immunologique du matériel sécrété après utilisation d'anticorps primaires dirigés contre le G-CSF humain : même légende qu'en A.

20 **Figure 14 :** Séquence nucléotidique du fragment de restriction MstII-HindIII du plasmide pYG1382 (SAH-Fv'). Les domaines VH (124 résidus) et VL (107 résidus) du fragment Fv' sont séparés par le linker synthétique (GGGGS)₃. La numérotation des acides aminés correspond à la protéine chimère SAH-Fv' mature (831 résidus).

25 **Figure 15 :** Sécrétion de la chimère SAH-Fv' par la souche CBS 293.91 transformée par le plasmide pYG1383 (LAC4) après 4 jours de croissance en erlenmeyers à 28°C en milieu YPD (piste 2), ou YPL (piste 3) ; standard de poids moléculaire (piste 1). Les dépôts, équivalents à 200 µl de culture (précipitation à l'éthanol), sont migrés en gel PAGE-SDS (8,5 %).

A, : coloration du gel au bleu de coomassie.

30 B, : caractérisation immunologique du matériel sécrété après utilisation d'anticorps primaires dirigés contre la SAH.

Figure 16 : Dosage de l'activité antagoniste in vitro de l'agglutination des plaquettes humaines fixées au formaldéhyde : CI50 des hybrides SAH-vWF694-708, [SAH-vWF470-713 C471G, C474G] et [SAH-vWF470-704 C471G, C474G] relativement à l'étalon RG12986. La détermination de l'inhibition dose-dépendante de l'agglutination plaquettaire est réalisée selon la méthode décrite par C. Prior et al. [Bio/Technology (1992) 10 66] en utilisant un agrégamètre enregistrant les variations de la transmission optique sous agitation à 37°C en présence de vWF humain, de botrocétine (8,2 mg/ml) et du produit à tester à différentes dilutions. La concentration du produit qui permet d'inhiber de moitié l'agglutination contrôle (en l'absence de produit) est alors déterminée (CI50).

Figure 17 : Activité sur la prolifération cellulaire in vitro de la lignée murine NFS60. La radioactivité (³H-thymidine) incorporée dans les noyaux cellulaires après 6 heures d'incubation est représentée en ordonnée (cpm) ; la quantité de produit indiquée en abscisse est exprimée en molarité (unités arbitraires).

Figure 18 : Activité sur la granulopoïèse in vivo chez le rat. Le nombre de neutrophiles (moyenne de 7 animaux) est indiquée en ordonnée en fonction du temps. Les produits testés sont la chimère SAH-G-CSF (pYG1266, 4 ou 40 mg/rat/jour), le G-CSF référence (10 mg/rat/jour), la SAH recombinante purifiée à partir de surnageant de Kluyveromyces lactis (SAH, 30 mg/rat/jour, cf. EP 361 991), ou du sérum physiologique.

EXEMPLES

TECHNIQUES GENERALES DE CLONAGE

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans Escherichia coli etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982 ; Ausubel F.M. et al.

(eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les enzymes de restriction ont été fournies par New England Biolabs (Biolabs), Bethesda Research Laboratories (BRL) ou Amersham et sont utilisées
5 selon les recommandations des fournisseurs.

Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

Pour les ligatures, les fragments d'ADN sont séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un
10 mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

Le remplissage des extrémités 5' proéminentes est effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'E. coli (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence
15 de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagenèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques est effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13
20 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] est effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les
25 spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques est effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

Les transformations de K. lactis avec l'ADN des plasmides d'expression des protéines de la présente invention sont effectuées par toute technique connue de
30 l'homme de l'art, et dont un exemple est donné dans le texte.

Sauf indication contraire, les souches bactériennes utilisées sont E. coli MC1060 (lacIPOZYA, X74, galU, galK, strA^r), ou E. coli TG1 (lac, proA,B, supE, thi, hsdD5 / F'traD36, proA⁺B⁺, lacI^q, lacZ, M15).

Les souches de levures utilisées appartiennent aux levures bourgeonnantes et plus particulièrement aux levures du genre Kluyveromyces. Les souche K. lactis MW98-8C (a. uraA. arg. lys. K⁺. pKD1^o) et K. lactis CBS 293.91 ont été particulièrement utilisées; un échantillon de la souche MW98-8C a été déposé le 16
5 Septembre 1988 au Centraalbureau voor Schimmelkulturen (CBS) à Baarn (Pays Bas) où il a été enregistré sous le numéro CBS 579.88.

Une souche bactérienne (E. coli) transformée avec le plasmide pET-8c52K a été déposée le 17 Avril 1990 auprès de l'American Type Culture Collection sous le numéro ATCC 68306.

10 Les souches de levures transformées par les plasmides d'expression codant pour les protéines de la présente invention sont cultivées en erlenmeyers ou en fermenteurs pilotes de 2l (SETRIC, France) à 28°C en milieu riche (YPD: 1% yeast extract, 2% Bactopeptone, 2% glucose; ou YPL: 1% yeast extract, 2% Bactopeptone, 2% lactose) sous agitation constante.

15 EXEMPLE 1 : COUPLAGE EN C-TERMINAL DE LA SAH

Le plasmide pYG404 est décrit dans la demande de brevet EP 361 991. Ce plasmide comporte un fragment de restriction HindIII codant pour le gène de la prépro-SAH précédé des 21 nucléotides naturellement présents immédiatement en amont de l'ATG initiateur de traduction du gène PGK de S. cerevisiae. La séquence
20 nucléotidique de ce fragment de restriction est incluse dans celle de la Figure 2. Le site MstII localisé dans la séquence codante, à trois résidus du codon spécifiant la fin de traduction est particulièrement utile comme site de clonage d'un peptide biologiquement actif que l'on désire coupler en phase traductionnelle en C-terminal de la SAH. Dans un mode de réalisation particulier, il est utile d'utiliser des peptides
25 dont la séquence est codée par un fragment de restriction MstII-HindIII du type : 5'-CCTTAGGCTTA [3xN]_p TAAGCTT-3', la séquence codant le peptide (p résidus) biologiquement actif est [3xN]_p. La ligature de ce fragment avec le fragment de restriction HindIII-MstII correspondant à la totalité du gène codant pour la SAH à l'exception des trois acides aminés les plus C-terminaux (résidus leucine-glycine-
30 leucine) génère un fragment de restriction HindIII comportant un gène hybride codant pour une protéine chimère du type SAH-PEPTIDE (Figure 1, panneau A), immédiatement précédée de la région d'exportation "prépro" de la SAH. Dans un

autre mode de réalisation, le peptide biologiquement actif peut être présent plus d'une fois dans la chimère.

EXEMPLE 2 : COUPLAGE EN N-TERMINAL DE LA SAH

Dans un mode réalisation particulier, les techniques combinées de mutagenèse dirigée et d'amplification PCR permettent de construire des gènes hybrides codant pour une protéine chimère résultant du couplage traductionnel entre un peptide signal (et par exemple la région prépro de la SAH), une séquence incluant le peptide biologiquement actif et la forme mature de la SAH ou un de ses variants moléculaires. Ces gènes hybrides sont préférentiellement bordés en 5' de l'ATG initiateur de traduction et en 3' du codon de fin de traduction par des sites de restriction HindIII et codent pour des protéines chimères du type PEPTIDE-SAH (Figure 1, panneau B). Dans un mode réalisation encore plus particulier, le peptide biologiquement actif peut être présent plus d'une fois dans la chimère.

EXEMPLE 3 : COUPLAGE EN N- ET C-TERMINAL DE LA SAH

Les techniques combinées de mutagenèse dirigée et d'amplification PCR décrites dans les exemples 1 et 2 permettent de construire des gènes hybrides codant pour une protéine chimère résultant du couplage traductionnel entre la forme mature de la SAH, ou un de ses variants moléculaires, et un peptide biologiquement actif couplé aux extrémités N- et C-terminales de la SAH. Ces gènes hybrides sont préférentiellement bordés en 5' de l'ATG initiateur de traduction et en 3' du codon de fin de traduction par des sites de restriction HindIII et codent pour des protéines chimères du type PEPTIDE-SAH-PEPTIDE (Figure 1, panneau C), immédiatement précédées de la région d'exportation "prépro" de la SAH. Dans un mode réalisation encore plus particulier, le peptide biologiquement actif peut être présent plus d'une fois dans la chimère.

EXEMPLE 4 : PLASMIDES D'EXPRESSION

Les protéines chimères des exemples précédents peuvent être exprimées dans les levures à partir de promoteurs fonctionnels, régulables ou constitutifs, tels que, par exemple, ceux présents dans les plasmides pYG105 (promoteur LAC4 de Kluyveromyces lactis), pYG106 (promoteur PGK de Saccharomyces cerevisiae), pYG536 (promoteur PHO5 de S.cerevisiae), ou des promoteur hybrides tels que ceux décrits dans la demande de brevet EP 361 991. Les plasmides pYG105 et pYG106 sont ici particulièrement utiles car ils permettent l'expression des gènes codés par les fragments de restriction HindIII tel que décrits dans les exemples précédents et clonés dans le site HindIII et dans l'orientation productive (définie comme l'orientation qui place la région "prépro" de l'albumine de façon proximale par rapport au promoteur de transcription), à partir de promoteurs fonctionnels chez K.lactis, régulables (pYG105) ou constitutifs (pYG106). Le plasmide pYG105 correspond au plasmide pKan707 décrit dans la demande de brevet EP 361 991 dans lequel le site de restriction HindIII unique et localisé dans le gène de résistance à la généticine (G418) a été détruit par mutagenèse dirigée tout en conservant une protéine inchangée (oligodeoxynucleotide 5'-GAAATGCATAAGCTCTTGCCATT-CTCACCG-3'). Le fragment Sall-SacI codant pour le gène URA3 du plasmide muté a été ensuite remplacé par un fragment de restriction Sall-SacI comportant une cassette d'expression constituée du promoteur LAC4 de K. lactis (sous la forme d'un fragment Sall-HindIII) et du terminateur du gène PGK de S. cerevisiae (sous la forme d'un fragment HindIII-SacI). Le plasmide pYG105 est mitotiquement très stable chez les levures Kluyveromyces et une carte de restriction en est donnée à la Figure 3. Les plasmides pYG105 et pYG106 ne diffèrent entre eux que par la nature du promoteur de transcription encodé par le fragment Sall-HindIII.

EXEMPLE 5 : TRANSFORMATION DES LEVURES

La transformation des levures appartenant au genre Kluyveromyces, et en particulier les souches MW98-8C et CBS 293.91 de K. lactis, s'effectue par exemple par la technique de traitement des cellules entières par de l'acétate de lithium [Ito H. et al., J. Bacteriol. 153 (1983) 163-168], adaptée comme suit. La croissance des cellules se fait à 28°C dans 50 ml de milieu YPD, avec agitation et jusqu'à une densité optique à 600 nm (DO₆₀₀) comprise entre 0,6 et 0,8; les cellules sont

récoltées par centrifugation à faible vitesse, lavées dans une solution stérile de TE (10 mM Tris HCl pH 7,4; 1 mM EDTA), resuspendues dans 3-4 ml d'acétate-lithium (0,1 M dans du TE) pour obtenir une densité cellulaire d'environ 2×10^8 cellules/ml, puis incubées à 30°C pendant 1 heure sous agitation modérée. Des aliquotes de 0,1
5 ml de la suspension résultante de cellules compétentes sont incubés à 30°C pendant 1 heure en présence d'ADN et à une concentration finale de 35% de polyéthylène glycol (PEG4000, Sigma). Après un choc thermique de 5 minutes à 42°C, les cellules sont lavées 2 fois, resuspendues dans 0,2 ml d'eau stérile et incubées 16 heures à 28°C dans 2 ml de milieu YPD pour permettre l'expression phénotypique du
10 gène de résistance au G418 exprimé sous contrôle du promoteur P_{k1} (cf. EP 361 991); 200 µl de la suspension cellulaire sont ensuite étalés sur boîtes YPD sélectives (G418, 200 µg/ml). Les boîtes sont mises à incuber à 28°C et les transformants apparaissent après 2 à 3 jours de croissance cellulaire.

EXEMPLE 6 : SECRETION DES CHIMERES

15 Après sélection sur milieu riche supplémenté en G418 les clones recombinants sont testés pour leur capacité à sécréter la forme mature des protéines chimères. Quelques clones correspondant à la souche CBS 293.91 ou MW98-8C transformée par les plasmides d'expression des chimères entre la SAH et la partie biologiquement active sont mis à incuber en milieu YPD ou YPL à 28°C. Les
20 surnageants cellulaires sont récupérés par centrifugation quand les cellules atteignent la phase stationnaire de croissance, éventuellement concentrés 10 fois par précipitation pendant 30 minutes à -20°C dans une concentration finale de 60% d'éthanol, puis testés après électrophorèse en gel SDS-PAGE à 8.5%, soit directement par coloration du gel par du bleu de coomassie, soit après immunoblot
25 en utilisant des anticorps primaires dirigés contre la partie biologiquement active ou un sérum polyclonal de lapin dirigé contre la SAH. Lors des expériences de détection immunologique, le filtre de nitrocellulose est d'abord incubé en présence des anticorps primaires spécifiques, lavé plusieurs fois, incubé en présence d'anticorps de chèvre dirigés contre les anticorps primaires, puis incubé en présence d'un complexe
30 avidine-péroxydase en utilisant le "kit ABC" distribué par Vectastain (Biosys S.A., Compiègne, France). La réaction immunologique est ensuite révélée par addition de diamino-3,3' benzidine tetrachlorhydrate (Prolabo) en présence d'eau oxygénée, selon les recommandations du fabricant.

EXEMPLE 7 : CHIMERES DERIVEES DU FACTEUR VON WILLEBRAND**E.7.1. Fragments antagonistes de la fixation du vWF aux plaquettes.****E.7.1.1. Résidus Thr470-Val713 du vWF.**

Le plasmide pET-8c52K comporte un fragment du cDNA du vWF codant
5 pour les résidus 445 à 733 du vWF humain et inclus donc plusieurs déterminants
cruciaux de l'interaction entre le vWF et les plaquettes d'une part, et certains
éléments de la membrane basale et du tissu sous-endothelial d'autre part, et
notamment les peptides G10 et D5 antagonistes de l'interaction entre vWF et GP1b
[Mori H. et al., J. Biol. Chem. 263 (1988) 17901-17904]. Cette séquence peptidique
10 est identique à la séquence correspondante décrite par Titani et al. [Biochemistry 25
(1986) 3171-3184]. L'amplification de ces déterminants génétiques peut être réalisée
à partir du plasmide pET-8c52K, par exemple par la technique d'amplification PCR,
en utilisant comme amorce des oligodéoxynucléotides codant pour des résidus
contigus localisés de part et d'autre de la séquence à amplifier. Les fragments
15 amplifiés sont ensuite clonés dans des vecteurs du type M13 en vue de leur
vérification par séquençage en utilisant soit les amorces universelles situées de part
et d'autre du multisite de clonage, soit des oligodéoxynucléotides spécifiques de la
région amplifiée du gène du vWF dont la séquence de plusieurs isomorphes est
connue [Sadler J.E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 82 (1985) 6394-6398; Verweij C.L.
20 et al., EMBO J. 5 (1986) 1839-1847; Shelton-Inloes B.B. et al., Biochemistry 25
(1986) 3164-3171; Bonthron D. et al., Nucleic Acids Res. 17 (1986) 7125-7127].
Ainsi, l'amplification PCR du plasmide pET-8c52K avec les oligodéoxynucléotides
5'-CCCGGGATCCCTTAGGCTTAACCTGTGAAGCCTGC-3' (Sq1969, le site
MstII est souligné) et 5'-CCCGGGATCCCAAGCTTAGACTTGTGCCATGTCG-3'
25 (Sq2029, le site HindIII est souligné) génère un fragment de restriction MstII-
HindIII incluant les résidus Thr470 à Val713 du vWF (Figure 4, panneau E). La
ligature de ce fragment avec le fragment de restriction HindIII-MstII correspondant à
la totalité du gène codant pour la SAH à l'exception des trois acides aminés les plus
C-terminaux (cf. Figure 2) génère un fragment de restriction HindIII comportant un
30 gène hybride codant pour une protéine chimère du type SAH-PEPTIDE (Figure 1,
panneau A), immédiatement précédée de la région d'exportation "prépro" de la SAH.
Ce fragment de restriction est cloné dans l'orientation productive et dans le site
HindIII du plasmide pYG105, ce qui génère le plasmide d'expression pYG1248
(SAH-vWF470-713).

E.7.1.2. Variants moléculaires:

Dans un autre mode de réalisation, le site de liaison du vWF est un peptide incluant les résidus Thr470 à Asp498 du vWF mature. Cette séquence inclut le peptide G10 (Cys474-Pro488) décrit par Mori et al. [J. Biol. Chem. 263 (1988) 17901-17904] et capable d'antagoniser l'interaction du vWF humain à la GP1b des plaquettes humaines. La séquence correspondant au peptide G10 est d'abord incluse dans un fragment de restriction MstII-HindIII (Figure 4, panneau B), par exemple par amplification PCR du plasmide pET-8c52K avec les oligodéoxynucléotides Sq1969 et 5'-CCCGGGATCCAAGCTTAGTCCTCCACATACAG-3' (Sq1970, le site HindIII est souligné), ce qui génère un fragment de restriction MstII-HindIII incluant le peptide G10, et dont la séquence est: 5'-CCTTAGGCTTAACCTGTGA-AGCCTGCCAGGAGCCGGGAGGCCTGGTGGTGCCTCCACAGATGCC-CCGGTGAGCCCCACCACTCTGTATGTGGAGGACTAAGCTT-3' (la séquence codant pour le peptide G10 est en caractères gras). La ligature de ce fragment avec le fragment de restriction HindIII-MstII correspondant à la totalité du gène codant pour la SAH à l'exception des trois acides aminés les plus C-terminaux (cf. Figure 2) génère un fragment de restriction HindIII comportant un gène hybride codant pour une protéine chimère du type SAH-PEPTIDE (Figure 1, panneau A), immédiatement précédée de la région d'exportation "prépro" de la SAH. Ce fragment de restriction est cloné dans l'orientation productive dans le site HindIII du plasmide pYG105, ce qui génère le plasmide d'expression pYG1214.

Dans un autre mode de réalisation, le site de liaison du vWF à la GP1b est directement conçu à l'aide d'oligodéoxynucléotides synthétiques, et par exemple les oligodéoxynucléotides 5'-TTAGGCCTCTGTGACCTTGCCCCTG-AAGCCCCTCCTCTACTCTGCCCCCTAAGCTTA-3' et 5'-GATC-TAAGCTTAGGGGGCAGAGTAGGAGGAGGGGCTTCAGGGGCAAGGTC-ACAGAGGCC-3'. Ces oligodéoxynucléotides forment en s'appariant un fragment de restriction MstII-BglII incluant le fragment MstII-HindIII (Figure 4, panneau C) correspondant au peptide D5 défini par les résidus Leu694 à Pro708 du vWF. La ligature du fragment MstII-HindIII avec le fragment de restriction HindIII-MstII correspondant à la totalité du gène codant pour la SAH à l'exception des trois acides aminés les plus C-terminaux (cf. Figure 2) génère un fragment de restriction HindIII comportant un gène hybride codant pour une protéine chimère du type SAH-PEPTIDE (Figure 1, panneau A), immédiatement précédée de la région d'exportation

"prépro" de la SAH. Ce fragment de restriction est cloné dans l'orientation productive dans le site HindIII du plasmide pYG105, ce qui génère le plasmide d'expression pYG1206.

Des variants utiles du plasmide pET-8c52K sont délétés par mutagenèse dirigée entre les peptides G10 et D5, par exemple des sites de fixation au collagène, et/ou à l'héparine, et/ou à la botrocétine, et/ou aux sulfatides et/ou à la ristocétine. Un exemple est le plasmide pMMB9 délété par mutagenèse dirigée entre les résidus Cys509 et Ile662. L'amplification PCR de ce plasmide avec les oligodéoxynucléotides Sq1969 et Sq2029 génère un fragment de restriction MstII-HindIII (Figure 4, panneau D) incluant les résidus Thr470 à Tyr508 et Arg663 à Val713 et en particulier les peptides G10 et D5 du vWF et délété en particulier de son site de fixation au collagène localisé entre les résidus Glu542 et Met622 [Roth G.J. et al. Biochemistry 25 (1986) 8357-8361]. La ligature de ce fragment avec le fragment de restriction HindIII-MstII correspondant à la totalité du gène codant pour la SAH à l'exception des trois acides aminés les plus C-terminaux (cf. Figure 2) génère un fragment de restriction HindIII comportant un gène hybride codant pour une protéine chimère du type SAH-PEPTIDE (Figure 1, panneau A), immédiatement précédée de la région d'exportation "prépro" de la SAH. Ce fragment de restriction est cloné dans l'orientation productive dans le site HindIII du plasmide pYG105, ce qui génère le plasmide d'expression pYG1223.

Dans d'autres modes de réalisation, l'utilisation des techniques combinées de mutagenèse dirigée et d'amplification PCR permet de générer à volonté des variants du fragment de restriction MstII-HindIII du panneau A de la Figure 4 mais délétés d'un ou plusieurs sites de fixation aux sulfatides et/ou à la botrocétine et/ou à l'héparine et/ou au collagène, et/ou substitué par tout résidu impliqué dans l'émergence de pathologies de type IIB associée au vWF.

Dans d'autres variants utiles du plasmide pET-8c52K des mutations sont introduites, par exemple par mutagenèse dirigée, pour remplacer ou supprimer tout ou partie de l'ensemble des cystéines présentes aux positions 471, 474, 509 et 695 du vWF humain. Des exemples particuliers sont les plasmides p5E et p7E dans lesquels les cystéines présentes aux positions 471 et 474 d'une part et aux positions 471, 474, 509 et 695 d'autre part ont été respectivement remplacés par des résidus glycine. L'amplification PCR de ces plasmides avec les oligodéoxynucléotides Sq2149 (5'-CCCGGGATCCCTTAGGCTTAACCGGTGAAGCCGGC-3', le site MstII est

souligné) et Sq2029 permet de générer des fragments de restriction MstII-HindIII incluant les résidus Thr470 à Val713 du vWF naturel à l'exception qu'au moins les résidus cystéine aux positions 471 et 474 ont été mutés en des résidus glycine. La ligature de ces fragments avec le fragment de restriction HindIII-MstII correspondant à la totalité du gène codant pour la SAH à l'exception des trois acides aminés les plus C-terminaux (cf. Figure 2) génère un fragment de restriction HindIII comportant un gène hybride codant pour une protéine chimère du type SAH-PEPTIDE (Figure 1, panneau A), immédiatement précédée de la région d'exportation "prépro" de la SAH. Ces fragments de restriction sont clonés dans l'orientation productive dans le site HindIII du plasmide pYG105, ce qui génère les plasmides d'expression pYG1283 (chimère SAH-vWF470-713, C471G, C474G) et pYG1279 (chimère SAH-vWF470-713, C471G, C474G, C509G, C695G).

D'autres mutations particulièrement utiles concernent au moins un résidu impliqué dans des pathologies de type IIB associées au vWF (augmentation de l'affinité intrinsèque du vWF pour la GP1b), comme les résidus Arg543, Arg545, Trp550, Val551, Val553, Pro574 ou Arg578 par exemple. Les techniques de recombinaison génétique *in vitro* permettent également d'introduire à volonté un ou des résidus supplémentaires dans la séquence du vWF et par exemple une méthionine surnuméraire entre les positions Asp539 et Glu542.

20 E.7.2. Fragments antagonistes de la fixation du vWF au sous endothélium.

Dans un mode de réalisation particulier, les sites de liaison du vWF aux composants du tissu sous-endothélial, et par exemple du collagène, sont générés par amplification PCR du plasmide pET-8c52K, par exemple avec les oligodéoxynucléotides Sq2258 (5'-GGATCCTTAGGGCTG-TGCAGCAGGCTACTGGACCTGGTC-3', le site MstII est souligné) et Sq2259 (5'-GAATTCAAGCTTAACAGAGGTAGCTAACGATCTCGTCCC-3', le site HindIII est souligné), ce qui génère un fragment de restriction MstII-HindIII codant pour les résidus Cys509 à Cys695 du vWF naturel. Des variants moléculaires de délétion ou modifiés sont également générés qui comportent toute combinaison souhaitable entre les sites de fixation du vWF aux sulfatides et/ou à la botrocétine et/ou à l'héparine et/ou au collagène et/ou tout résidu responsable d'une modification de l'affinité du vWF pour la GP1b (pathologies de type II associée au vWF). Dans un autre mode de réalisation, le domaine capable de se fixer au collagène peut également provenir du

fragment du vWF compris entre les résidus 911 et 1114 et décrit par Pareti et al. [J. Biol. Chem. (1987) 262: 13835-13841]. La ligature de ces fragments avec le fragment de restriction HindIII-MstII correspondant à la totalité du gène codant pour la SAH à l'exception des trois acides aminés les plus C-terminaux (cf. Figure 2) génère des fragments de restriction HindIII comportant un gène hybride codant pour une protéine chimère du type SAH-PEPTIDE (Figure 1, panneau A), immédiatement précédée de la région d'exportation "prépro" de la SAH. Ces fragments de restriction sont clonés dans l'orientation productive dans le site HindIII du plasmide pYG105, ce qui génère les plasmides d'expression correspondants, et par exemple le plasmide pYG1277 (SAH-vWF509-695).

E.7.3. Purification et caractérisation moléculaire des chimères entre SAH et vWF.

Les chimères présentes dans les surnageants de culture correspondant à la souche CBS 293.91 transformée, par exemple par les plasmides d'expression selon les exemples E.7.1. et E.7.2., sont caractérisées dans un premier temps à l'aide d'anticorps spécifiques de la partie SAH et de la partie vWF. Les résultats des Figures 5 à 7 démontrent que la levure K. lactis est capable de sécréter des protéines chimères entre la SAH et un fragment du vWF, et que ces chimères sont immunologiquement réactives. Il peut être également souhaitable de purifier certaines de ces chimères. La culture est alors centrifugée (10000 g, 30 min), le surnageant est passé à travers un filtre de 0,22 µm (Millipore), puis concentré par ultrafiltration (Amicon) en utilisant une membrane dont le seuil de discrimination se situe à 30 kDa. Le concentrat obtenu est alors dialysé contre une solution de Tris HCl (50 mM pH 8) puis purifié sur colonne. Par exemple, le concentrat correspondant au surnageant de culture de la souche CBS 293.91 transformée par le plasmide pYG1206 est purifiée par chromatographie d'affinité sur Bleu-Trisacryl (IBF). Une purification par chromatographie d'échange d'ions peut également être utilisée. Par exemple dans le cas de la chimère SAH-vWF470-713, le concentrat obtenu après ultrafiltration est dialysé contre une solution de Tris HCl (50 mM pH 8), puis déposé par fractions de 20 ml sur une colonne (5 ml) échangeuse de cations (S Fast Flow, Pharmacia) équilibrée dans le même tampon. La colonne est alors lavée plusieurs fois par la solution de Tris HCl (50 mM pH 8) et la protéine chimère est alors éluée de la colonne par un gradient (0 à 1 M) de NaCl. Les fractions contenant la protéine chimère sont alors réunies et dialysées contre une solution de

Tris HCl 50 mM (pH 8) puis redéposées sur colonne S Fast Flow. Après élution de la colonne, les fractions contenant la protéine sont réunies, dialysées contre de l'eau et lyophilisées avant caractérisation: par exemple, le séquençage (Applied Biosystem) de la protéine [SAH-vWF470-704 C471G, C474G] sécrétée par la levure CBS 5 293.91 donne la séquence N-terminale attendue de la SAH (Asp-Ala-His...), démontrant une maturation correcte de la chimère immédiatement en C-terminal du doublet de résidus Arg-Arg de la région "pro" de la SAH (Figure 2). Le caractère essentiellement monomérique des protéines chimères entre SAH et vWF est également confirmé par leur profil d'élution sur colonne TSK 3000 [Toyo Soda 10 Company, équilibrée par une solution de cacodylate (pH 7) contenant 0,2 M de Na₂SO₄] : par exemple la chimère [SAH-vWF 470-704 C471G, C474G] se comporte dans ces conditions comme une protéine de poids moléculaire apparent de 95 kDa démontrant son caractère monomérique.

EXEMPLE 8 : CHIMERES DERIVEES DE L'UROKINASE

15 E.8.1. Constructions.

Un fragment correspondant au fragment amino-terminal de l'urokinase (ATF: domaine EGF-like + domaine kringle) peut être obtenu à partir de l'ARN messenger correspondant des cellules de certains carcinome humain, par exemple en utilisant le kit RT-PCR distribué par Pharmacia. Un fragment de restriction MstII-HindIII 20 incluant l'ATF de l'urokinase humaine est donné à la Figure 8. La ligature du fragment HindIII-MstII du plasmide pYG404 avec ce fragment MstII-HindIII permet de générer le fragment HindIII du plasmide pYG1341 qui code pour une protéine chimère dans laquelle la molécule de SAH est génétiquement couplée à l'ATF (SAH-UK1->135). De façon similaire, le plasmide pYG1340 contient un fragment HindIII 25 codant pour une chimère composée de la SAH immédiatement suivi par les 46 premiers résidus de l'urokinase humaine (SAH-UK1->46, cf. Figure 8). Le clonage dans l'orientation productive du fragment de restriction HindIII du plasmide pYG1340 (SAH-UK1->46) dans le site HindIII des plasmides pYG105 (LAC4) et pYG106 (PGK) génère les plasmides d'expression pYG1343 et pYG1342, 30 respectivement. De façon similaire, le clonage dans l'orientation productive du fragment de restriction HindIII du plasmide pYG1341 (SAH-UK1->135) dans le site HindIII des plasmides pYG105 (LAC4) et pYG106 (PGK) génère les plasmides d'expression pYG1345 et pYG1344, respectivement.

E.8.2. Sécrétion des hybrides.

Après sélection sur milieu riche supplémenté en G418 les clones recombinants sont testés pour leur capacité à sécréter la forme mature des protéines chimères SAH-UK. Quelques clones correspondant à la souche K. lactis CBS 293.91 transformée par les plasmides d'expression selon l'exemple E.9.1. sont mis à incuber en milieu liquide complet sélectif à 28°C. Les surnageants cellulaires sont alors testés après électrophorèse en gel d'acrylamide à 8.5 %, soit directement par coloration du gel au bleu de coomassie, soit après immunoblot en utilisant comme anticorps primaires un sérum polyclonal de lapin dirigé contre l'albumine humaine ou contre l'urokinase humaine. Les résultats de la Figure 9 démontrent que les protéines hybrides SAH-UK1->46 et SAH-UK1->135 sont particulièrement bien sécrétées par la levure Kluyveromyces.

E.8.3. Purification des chimères entre SAH et urokinase.

Après centrifugation d'une culture de la souche CBS 293.91 transformée par les plasmides d'expression selon l'exemple E.8.1., le surnageant de culture est passé à travers un filtre de 0,22 mm (Millipore), puis concentré par ultrafiltration (Amicon) en utilisant une membrane dont le seuil de discrimination se situe à 30 kDa. Le concentrat obtenu est alors ajusté à 50 mM Tris HCl à partir d'une solution stock de Tris HCl 1M (pH 7), puis déposé par fractions de 20 ml sur une colonne (3 ml) échangeuse d'anions (D-Zephyr, Sepracor) équilibrée dans le même tampon. La protéine chimère (SAH-UK1->46 ou SAH-UK1->135) est alors éluée de la colonne par un gradient (0 à 1 M) de NaCl. Les fractions contenant la protéine chimère sont alors réunies et dialysées contre une solution de Tris HCl 50 mM (pH 6) et redéposées sur colonne D-Zephyr équilibrée dans le même tampon. Après élution de la colonne, les fractions contenant la protéine sont réunies, dialysées contre de l'eau et lyophilisées avant caractérisation de leur activité biologique et notamment vis à vis de leur aptitude à déplacer l'urokinase de son récepteur cellulaire.

EXEMPLE 9 : CHIMERES DERIVEES DU G-CSF

E.9.1. Constructions.

E.9.1.1. Couplage en C-terminal de la SAH.

Un fragment de restriction MstII-HindIII incluant la forme mature du G-CSF humain est généré, par exemple selon la stratégie suivante : un fragment de

restriction KpnI-HindIII est d'abord obtenu par la technique d'amplification enzymatique PCR en utilisant les oligodéoxynucléotides Sq2291 (5'-CAAGGATCCAAGCTTCAGGGCTGCGCAAGGTGGCGTAG-3', le site HindIII est souligné) et Sq2292 (5'-CGGGGTACCTTAGGCTTAACCCCCCTG-
5 GGCCCTGCCAGC-3', le site KpnI est souligné) comme amorce sur le plasmide BBG13 servant comme matrice. Le plasmide BBG13 comporte le gène codant pour la forme B (174 acides aminés) du G-CSF mature humain, obtenu auprès de British Bio-technology Limited, Oxford, England. Le produit d'amplification enzymatique d'environ 550 nucléotides est ensuite digéré par les enzymes de restriction KpnI et
10 HindIII et cloné dans le vecteur pUC19 coupé par les mêmes enzymes, ce qui génère le plasmide recombinant pYG1255. Ce plasmide est la source d'un fragment de restriction MstII-HindIII permettant de fusionner le G-CSF immédiatement en aval de la SAH (chimère SAH-G-CSF) et dont la séquence nucléotidique est donnée à la Figure 10.

15 Il peut être également souhaitable d'insérer un linker peptidique entre la partie SAH et G-CSF, par exemple pour permettre une meilleure présentation fonctionnelle de la partie transductrice. Un fragment de restriction MstII-HindIII est par exemple généré par substitution du fragment MstII-ApaI du plasmide pYG1255 par les oligodéoxynucléotides Sq2742 (5'-TTAGGCTTAGGTGGTGGCGGTACCCCC-
20 TGGGCC-3', les codons codant pour les résidus glycine de ce linker particulier sont soulignés) et Sq2741 (5'-CAGGGGGGTACCGCCACCACCTAAGCC-3') qui forment en s'appariant un fragment MstII-ApaI. Le plasmide ainsi généré comporte donc un fragment de restriction MstII-HindIII, dont la séquence est identique à celle de la Figure 10 à l'exception du fragment MstII-ApaI.

25 La ligature du fragment HindIII-MstII du plasmide pYG404 avec le fragment MstII-HindIII du plasmide pYG1255 permet de générer le fragment HindIII du plasmide pYG1259 qui code pour une protéine chimère dans laquelle la forme B du G-CSF mature est positionnée par couplage génétique en phase traductionnelle en C-terminal de la molécule de SAH (SAH-G-CSF).

30 Un fragment de restriction HindIII identique à l'exception du fragment MstII-ApaI peut également être facilement généré et qui code pour une protéine chimère dans laquelle la forme B du G-CSF mature est positionnée par couplage génétique en phase traductionnelle en C-terminal de la molécule de SAH et d'un linker peptidique

particulier. Par exemple ce linker est constitué de 4 résidus glycine dans le fragment HindIII du plasmide pYG1336 (chimère SAH-Gly4-G-CSF).

Le fragment de restriction HindIII du plasmide pYG1259 est cloné dans l'orientation productive et dans le site de restriction HindIII du plasmide d'expression pYG105, ce qui génère le plasmide d'expression pYG1266 (SAH-G-CSF). Dans une
5 autre exemplification, le clonage du fragment de restriction HindIII du plasmide pYG1259 dans l'orientation productive et dans le site HindIII du plasmide pYG106 génère le plasmide pYG1267. Les plasmides pYG1266 et pYG1267 sont isogéniques entre eux à l'exception du fragment de restriction Sall-HindIII codant pour le
10 promoteur LAC4 de K. lactis (plasmide pYG1266) ou le promoteur PGK de S. cerevisiae (plasmide pYG1267).

Dans une autre exemplification, le clonage dans l'orientation productive du fragment de restriction HindIII du plasmide pYG1336 (chimère SAH-Gly4-G-CSF) dans le site HindIII des plasmides pYG105 (LAC4) et pYG106 (PGK) génère les
15 plasmides d'expression pYG1351 et pYG1352, respectivement.

E.9.1.2. Couplage en N-terminal de la SAH.

Dans un mode réalisation particulier, les techniques combinées de mutagenèse dirigée et d'amplification PCR permettent de construire des gènes hybrides codant pour une protéine chimère résultant du couplage traductionnel entre
20 un peptide signal (et par exemple la région prépro de la SAH), une séquence incluant un gène ayant une activité G-CSF, et la forme mature de la SAH ou un de ses variants moléculaires (cf. chimère du panneau B, Figure 1). Ces gènes hybrides sont préférentiellement bordés en 5' de l'ATG initiateur de traduction et en 3' du codon de fin de traduction par des sites de restriction HindIII. Par exemple l'oligodéoxynucléotide Sq2369 (5'-GTTCTACGCCACCTTGCGCAGCCCCGGTGGAGGCGGT-
25 GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGG-3', les résidus soulignés (optionnels) correspondent dans cette chimère particulière à un linker peptidique composé de 4 résidus glycine) permet par mutagenèse dirigée de mettre en phase traductionnelle la forme mature du G-CSF humain du plasmide BBG13
30 immédiatement en amont de la forme mature de la SAH, ce qui génère le plasmide intermédiaire A. De façon similaire, l'utilisation de l'oligodéoxynucléotide Sq2338 [5'-CAGGGAGCTGGCAGGGCCCCAGGGGGTTTCGACGAAACACCCCCCTG-GAATAAGCCGAGCT-3' (brin non codant), les nucléotides complémentaires aux nucléotides codant pour les premiers résidus N-terminaux de la forme mature du G-

CSF humain sont soulignés] permet par mutagenèse dirigée de coupler en phase traductionnelle de lecture la région prépro de la SAH immédiatement en amont de la forme mature du G-CSF humain, ce qui génère le plasmide intermédiaire B. On génère ensuite un fragment HindIII codant pour une protéine chimère du type
5 PEPTIDE-SAH (cf. Figure 1, panneau B) en associant le fragment HindIII-SstI du plasmide B (jonction région prépro de la SAH + fragment N-terminal du G-CSF mature) avec le fragment SstI-HindIII du plasmide A [jonction G-CSF mature-(glycine)₄-SAH mature]. Le plasmide pYG1301 contient ce fragment de restriction HindIII particulier codant pour la chimère G-CSF-Gly4-SAH fusionnée
10 immédiatement en aval de la région prépro de la SAH (Figure 11). Le clonage de ce fragment de restriction HindIII dans l'orientation productive et dans le site HindIII des plasmides pYG105 (LAC4) et pYG106 (PGK) génère les plasmides d'expression pYG1302 et pYG1303, respectivement.

E.9.2. Sécrétion des hybrides.

15 Après sélection sur milieu riche supplémenté en G418 les clones recombinants sont testés pour leur capacité à sécréter la forme mature des protéines chimères entre SAH et G-CSF. Quelques clones correspondant à la souche K. lactis CBS 293.91 transformée par les plasmides pYG1266 ou pYG1267 (SAH-G-CSF), pYG1302 ou pYG1303 (G-CSF-Gly4-SAH) ou encore pYG1351 ou pYG1352
20 (SAH-Gly4-G-CSF) sont mis à incuber en milieu liquide complet sélectif à 28°C. Les surnageants cellulaires sont alors testés après électrophorèse en gel d'acrylamide à 8.5 %, soit directement par coloration du gel au bleu de coomassie, soit après immunoblot en utilisant comme anticorps primaires des anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre le G-CSF humain ou un sérum polyclonal de lapin dirigé contre
25 l'albumine humaine. Les résultats de la Figure 12 démontrent que la protéine hybride SAH-G-CSF est reconnue à la fois par des anticorps dirigés contre l'albumine humaine (panneau C) et le G-CSF humain (panneau B). Les résultats de la Figure 13 indiquent que la chimère SAH-Gly4-G-CSF (piste 3) est particulièrement bien sécrétée par la levure Kluyveromyces, possiblement du fait que la présence du linker
30 peptidique entre partie SAH et partie G-CSF est plus favorable à un repliement indépendant de ces 2 parties lors du transit de la chimère dans la voie sécrétoire. De plus la fusion N-terminale (G-CSF-Gly4-SAH) est également sécrétée par la levure Kluyveromyces (Figure 13, piste 1).

E.9.3. Purification et caractérisation moléculaire des chimères entre SAH et G-CSF.

Après centrifugation d'une culture de la souche CBS 293.91 transformée par les plasmides d'expression selon l'exemple E.9.1., le surnageant de culture est passé à travers un filtre de 0,22 µm (Millipore), puis concentré par ultrafiltration (Amicon) en utilisant une membrane dont le seuil de discrimination se situe à 30 kDa. Le concentrat obtenu est alors ajusté à 50 mM Tris HCl à partir d'une solution stock de Tris HCl 1M (pH 6), puis déposé par fractions de 20 ml sur une colonne (5 ml) échangeuse d'ions (Q Fast Flow, Pharmacia) équilibrée dans le même tampon. La protéine chimère est alors éluée de la colonne par un gradient (0 à 1 M) de NaCl. Les fractions contenant la protéine chimère sont alors réunies et dialysées contre une solution de Tris HCl 50 mM (pH 6) et redéposées sur colonne Q Fast Flow (1 ml) équilibrée dans le même tampon. Après élution de la colonne, les fractions contenant la protéine sont réunies, dialysées contre de l'eau et lyophilisées avant caractérisation: par exemple, le séquençage (Applied Biosystem) de la protéine SAH-G-CSF sécrétée par la levure CBS 293.91 donne la séquence N-terminale attendue de la SAH (Asp-Ala-His...), démontrant une maturation correcte de la chimère immédiatement en C-terminal du doublet de résidus Arg-Arg de la région "pro" de la SAH (Figure 2).

EXEMPLE 10 : CHIMERES DERIVEES D'UNE IMMUNOGLOBULINE

E.10.1. Constructions.

Un fragment Fv' peut être construit par les techniques du génie génétique, et qui code pour les fragments variables des chaînes lourdes et légères d'une immunoglobuline (Ig), reliés entre eux par un peptide linker [Bird et al., Science (1988) 242: 423 ; Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 5879]. Schématiquement, les régions variables (environ 120 résidus) des chaînes lourdes et légères d'une Ig donnée sont clonées à partir de l'ARN messager de l'hybridome correspondant, par exemple en utilisant le kit RT-PCR distribué par Pharmacia (Mouse ScFv Module). Dans une seconde étape les régions variables sont génétiquement couplées par génie génétique par l'intermédiaire d'un peptide de liaison synthétique et par exemple le linker (GGGS)₃. Un fragment de restriction MstII-HindIII incluant le fragment Fv' d'une immunoglobuline sécrétée par un hybridome murin est donné à la Figure 14. La ligature du fragment HindIII-MstII du

plasmide pYG404 avec ce fragment MstII-HindIII permet de générer le fragment HindIII du plasmide pYG1382 qui code pour une protéine chimère dans laquelle la molécule de SAH est génétiquement couplée au fragment Fv' de la Figure 14 (chimère SAH-Fv'). Le clonage dans l'orientation productive du fragment de restriction HindIII du plasmide pYG1382 dans le site HindIII des plasmides pYG105 (LAC4) et pYG106 (PGK) génère les plasmides d'expression pYG1383 et pYG1384, respectivement.

E.10.2. Sécrétion des hybrides.

Après sélection sur milieu riche supplémenté en G418 les clones recombinants sont testés pour leur capacité à sécréter la forme mature de la protéine chimère SAH-Fv'. Quelques clones correspondant à la souche K. lactis CBS 293.91 transformée par les plasmides pYG1383 ou pYG1384 (SAH-Fv') sont mis à incuber en milieu liquide complet sélectif à 28°C. Les surnageants cellulaires sont alors testés après électrophorèse en gel d'acrylamide à 8.5 %, soit directement par coloration du gel au bleu de coomassie, soit après immunoblot en utilisant comme anticorps primaires un sérum polyclonal de lapin dirigé contre l'albumine humaine, ou directement incubée avec des anticorps biotinylés et dirigés contre les immunoglobulines d'origine murine. Les résultats de la Figure 15 démontrent que la protéine hybride SAH-Fv' est reconnue à la fois par des anticorps dirigés contre l'albumine humaine (panneau C) et réagit avec des anticorps de chèvre biotinylés immunologiquement réactifs à l'encontre d'immunoglobulines de souris (panneau B).

EXEMPLE 11 : ACTIVITE BIOLOGIQUE DES CHIMERES

E.11.1. Activité biologique *in vitro*.

E.11.1.1. Chimères entre SAH et vWF.

L'activité antagoniste des produits est déterminée par mesure de l'inhibition dose-dépendante de l'agglutination des plaquettes humaines fixées au paraformaldéhyde selon la méthode décrite par Prior et al. [Bio/Technology (1992) 10: 66]. Les mesures se font dans un agrégamètre (PAP-4, Bio Data, Horsham, PA, USA) qui enregistre les variations au cours du temps de la transmission optique sous agitation à 37°C en présence de vWF, de botrocétine (8,2 mg/ml) et du produit à tester à différentes dilutions (concentrations). Pour chaque mesure, 400 µl (8x10⁷ plaquettes) d'une suspension de plaquettes humaines stabilisées au paraformaldéhyde

(0,5 %, puis resuspendues en [NaCl (137 mM) ; MgCl₂ (1 mM) ; NaH₂PO₄ (0,36 mM) ; NaHCO₃ (10 mM) ; KCl (2,7 mM) ; glucose (5,6 mM) ; SAH (3,5 mg/ml) ; tampon HEPES (10 mM, pH 7,35)] sont préincubés à 37°C dans la cuve cylindrique (8,75 x 50 mm, Wellcome Distriwell, 159 rue Nationale, Paris) de l'agrégamètre pendant 4 min puis sont additionnés de 30 ml de la solution du produit à tester à différentes dilutions dans du véhicule de formulation apyrogène [mannitol (50 g/l) ; acide citrique (192 mg/l) ; L-lysine monochlorhydratée (182,6 mg/l) ; NaCl (88 mg/l) ; pH ajusté à 3,5 par addition de NaOH (1M)], ou de véhicule de formulation uniquement (essai contrôle). La suspension résultante est alors incubée pendant 1 min à 37°C et on ajoute 12,5 ml de vWF humain [American Bioproducts, Parsippany, NJ, USA; 11 % d'activité von Willebrand mesurée selon les recommandations d'utilisation du PAP-4 (Platelet Aggregation Profiler^R) à l'aide de plaquettes fixées au formaldéhyde (2x10⁵ plaquettes/ml), de plasma humain contenant de 0 à 100 % de vWF et de ristocétine (10 mg/ml, cf. p. 36-45 : vW ProgramTM] que l'on incube à 37°C pendant 1 min avant d'ajouter 12,5 ml de la solution de botrocétine [purifiée à partir de venin lyophilisé de Bothrops jararaca (Sigma), selon le protocole décrit par Sugimoto et al., Biochemistry (1991) 266: 18172]. L'enregistrement de la lecture de la transmission en fonction du temps est alors réalisée pendant 2 min sous agitation à l'aide d'un barreau aimanté (Wellcome Distriwell) placé dans la cuve et sous une agitation magnétique de 1100 tr/min assurée par l'agrégamètre. La variation moyenne de la transmission optique (n³⁵ pour chaque dilution) au cours du temps est donc une mesure de l'agglutination plaquettaire due à la présence de vWF et de botrocétine, en l'absence ou en présence de concentrations variables du produit à tester. A partir de tels enregistrements, on détermine alors le % d'inhibition de l'agglutination plaquettaire due à chaque concentration de produit et on trace la droite donnant le % d'inhibition en fonction de l'inverse de la dilution de produit en échelle log-log. La CI50 (ou concentration de produit provoquant 50 % d'inhibition de l'agglutination) est alors déterminée sur cette droite. Le Tableau de la Figure 16 compare les CI50 de quelques unes des chimères SAH-vWF de la présente invention et démontre que certaines d'entre elles sont de meilleurs antagonistes de l'agglutination plaquettaire que le produit RG12986 décrit par Prior et al. [Bio/Technology (1992) 10: 66] et inclus dans les essais à titre de valeur étalon. Des tests identiques de l'inhibition de l'agglutination de plaquettes humaines en présence de vWF de plasma de porc (Sigma) permet en plus de

démontrer que certains des hybrides de la présente invention, et notamment certains variants de type IIB, sont de très bons antagonistes de l'agglutination plaquettaire en l'absence de co-facteurs de type botrocétine. L'antagonisme botrocétine-indépendant de ces chimères particulières peut également être démontré selon le protocole
5 initialement décrit par Ware et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. (1991) 88: 2946] par déplacement de l'anticorps monoclonal ^{125}I -LJ-IB1 (10 mg/ml), un inhibiteur compétitif de la fixation du vWF sur la GPIb plaquettaire [Handa M. et al., (1986) J. Biol. Chem. 261: 12579] après 30 min d'incubation à 22°C en présence de plaquettes fraîches (10^8 plaquettes/ml).

10 E.11.1.2. Chimères entre SAH et G-CSF.

Les chimères purifiées sont testées pour leur capacité à permettre la prolifération *in vitro* de la lignée murine IL3-dépendante NFS60, par mesure de l'incorporation de thymidine tritiée essentiellement selon le protocole décrit par Tsuchiya et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. (1986) 83 7633]. Pour chaque chimère, les
15 mesures sont réalisées entre 3 et 6 fois dans un test trois points (trois dilutions du produit) dans une zone où la relation entre quantité de produit actif et incorporation de thymidine marquée (Amersham) est linéaire. Dans chaque plaque de microtitration, l'activité d'un produit référence constitué de G-CSF humain recombinant exprimé dans des cellules mammifères est également systématiquement
20 incorporé. Les résultats de la Figure 17 démontrent que la chimère SAH-G-CSF (pYG1266) sécrétée par la levure *Kluyveromyces* et purifiée selon l'exemple E.9.3. est capable *in vitro* de transduire un signal de prolifération cellulaire pour la lignée NFS60. Dans ce cas particulier, l'activité spécifique (cpm/molarité) de la chimère est environ 7 fois plus faible que celle du G-CSF référence (non couplé).

25 E.11.2. Activité biologique *in vivo*.

L'activité de stimulation des chimères SAH/G-CSF sur la granulopoïèse *in vivo* est testée après injection sous-cutanée chez le rat (Sprague-Dawley/CD, 250-300 g, 8-9 semaines) et comparée à celle du G-CSF référence exprimé à partir de cellules de mammifère. Chaque produit, testé à raison de 7 animaux, est injecté par
30 voie sous-cutanée en région dorso-scapulaire à raison de 100 µl pendant 7 jours consécutifs (J1-J7). 500 µl de sang sont recueillis aux jours J-6, J2 (avant la 2^{ème} injection), J5 (avant la 5^{ème} injection) et J8, et une numération sanguine est effectuée. Dans ce test, l'activité spécifique (unités de neutropoïèse/mole injectée) de la chimère SAH-G-CSF (pYG1266) est identique à celle du G-CSF référence

(Figure 18). Puisque cette chimère particulière possède in vitro une activité spécifique 7 fois plus faible que celle du G-CSF référence (Figure 17), il est donc démontré que le couplage génétique du G-CSF sur la SAH en modifie favorablement les propriétés pharmacocinétiques.

LISTE DE SEQUENCES

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1859 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLACEMENT: 26..1855
- (D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /product= "Chimere de type
SAH-Peptide"

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: misc feature
- (B) EMBLACEMENT: 1842..1848
- (D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /standard_name= "Site Mst II"

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 750 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLACEMENT: 3..746
- (D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /product= "Fragment C-ter de la
chimere SAH-vWF470"

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 423 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

FEUILLE DE REMPLACEMENT

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLACEMENT: 3..419
- (D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /product= "Fragment C-ter de la chimere SAH-UK1-135"

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 541 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLACEMENT: 3..536
- (D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /product= "Fragment C-ter de la chimere SAH-G.CSF"

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 2455 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLACEMENT: 26..2389
- (D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /product= "Chimere G.CSF-Gly4-SAH en aval region prepro de SAH"

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: misc recomb
- (B) EMBLACEMENT: 620..631
- (D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /standard_name= "Linker PolyGly"

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: misc feature
- (B) EMBLACEMENT: 106..111
- (D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /standard_name= "Site Apa I"

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 756 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique

FEUILLE DE REMPLACEMENT

- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADnc
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON
- (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:
 - (A) NOM/CLE: CDS
 - (B) EMBLACEMENT: 3..752
 - (D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /product= "Fragment C-ter de la chimere SAH-Fv"
- (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:
 - (A) NOM/CLE: misc_recomb
 - (B) EMBLACEMENT: 384..428
 - (D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /standard_name= "Linker synthétique"

FEUILLE DE REMPLACEMENT

REVENDICATIONS

1. Polypeptide recombinant comportant une partie active dérivée d'un polypeptide ayant une activité thérapeutique, génétiquement couplée à une albumine ou à un variant de l'albumine.

5 2. Polypeptide selon la revendication 1 caractérisé en ce que le polypeptide ayant une activité thérapeutique est un polypeptide d'origine humaine.

3. Polypeptide selon la revendication 2 caractérisé en ce que le polypeptide ayant une activité thérapeutique est choisi parmi tout ou partie des enzymes, des inhibiteurs d'enzymes, des antigènes, des anticorps, des hormones, des facteurs de la coagulation, des interférons, des cytokines, des facteurs de croissance et/ou de différenciation, des facteurs impliqués dans la genèse/résorption des tissus osseux, des facteurs chimiotactiques, des facteurs de motilité ou de migration cellulaire, des facteurs cytostatiques, des facteurs bactéricides ou antifongiques, ou des molécules adhésives plasmatiques, interstitielles ou des matrices extracellulaires.

15 4. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que le polypeptide ayant une activité thérapeutique est choisi parmi toute séquence peptidique antagoniste ou agoniste d'interactions moléculaires et/ou cellulaires impliquées dans les pathologies des compartiments circulatoires et interstitiels.

20 5. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que la partie active présente une structure choisie parmi :

(a) la structure peptidique entière ou,

(b) un fragment de (a) ou une structure dérivée de (a) par modification structurale (mutation, substitution addition et/ou délétion d'un ou plusieurs résidus) et conservant une activité thérapeutique.

25 6. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé en ce que la partie active est couplée à l'extrémité N-terminale de l'albumine.

7. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé en ce que la partie active est couplée à l'extrémité C-terminale de l'albumine.

8. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que la partie active y est représenté plusieurs fois.

9. Séquence nucléotidique codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.

5 10. Séquence nucléotidique selon la revendication 9 caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence "leader" permettant la sécrétion du polypeptide exprimé.

10 11. Cassette d'expression comprenant une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 9 ou 10 sous le contrôle d'une région d'initiation de la transcription et éventuellement d'une région de terminaison de la transcription.

12. Plasmide autorépliquatif comportant une cassette d'expression selon la revendication 11.

15 13. Cellule recombinante eucaryote ou procaryote dans laquelle a été inséré une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 9 ou 10 ou une cassette d'expression selon la revendication 11 ou un plasmide selon la revendication 12.

14. Cellule recombinante selon la revendication 13 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une levure, d'une cellule animale, d'un champignon ou d'une bactérie.

15. Cellule recombinante selon la revendication 14 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une levure.

20 16. Cellule recombinante selon la revendication 15 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une levure du genre Saccharomyces ou Kluyveromyces.

25 17. Procédé de préparation d'un polypeptide tel que défini dans l'une des revendications 1 à 8 caractérisé en ce que l'on cultive une cellule recombinante selon l'une des revendications 13 à 16 dans des conditions d'expression, et on récupère le polypeptide produit.

18. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs polypeptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.

19. Composition pharmaceutique comprenant une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 9 à 11 utilisable en thérapie génique.

Figure 1A

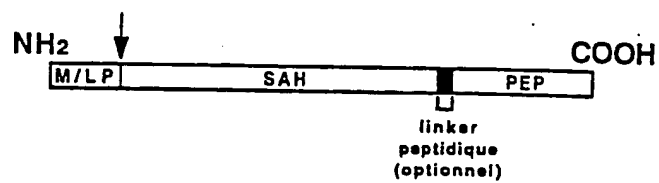


Figure 1B

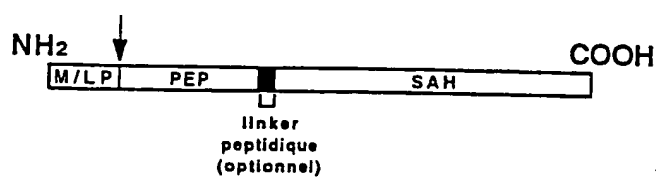


Figure 1C

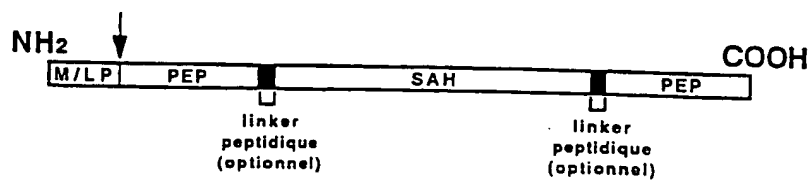


Figure 1

FEUILLE DE REMPLACEMENT

SEQ ID NO: 1

AAGCT TTACAACAAA TATAAAAACA ATG AAG TGG GTA ACC TTT ATT TCC CTT CTT TTT CTC TTT	-12
Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe	
AGC TCG GCT TAT TCC AGG GGT GTG TTT CGT CGA GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT CAT	9
Ser Ser Ala Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His	
CGG TTT AAA GAT TTG GGA GAA GAA AAT TTC AAA GCC TTG GTG TTG ATT GCC TTT GCT CAG	29
Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln	
TAT CTT CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT CAT GTA AAA TTA GTG AAT GAA GTA ACT GAA TTT	49
Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe	
GCA AAA ACA TGT GTT GCT GAT GAG TCA GCT GAA AAT TGT GAC AAA TCA CTT CAT ACC CTT	69
Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu	
TTT GGA GAC AAA TTA TGC ACA GTT GCA ACT CTT CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC	89
Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp	
TGC TGT GCA AAA CAA GAA CCT GAG AGA AAT GAA TGC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC	109
Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn	
CCA AAC CTC CCC CGA TTG GTG AGA CCA GAG GTT GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT CAT GAC	129
Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp	
AAT GAA GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT GAA ATT GCC AGA AGA CAT CCT TAC TTT	149
Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe	
TAT GCC CCG GAA CTC CTT TTC TTT GCT AAA AGG TAT AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT TGC	169
Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys	
CAA GCT GCT GAT AAA GCT GCC TGC CTG TTG CCA AAG CTC GAT GAA CTT CGG GAT GAA GGG	189
Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly	
AAG GCT TCG TCT GCC AAA CAG AGA CTC AAG TGT GCC AGT CTC CAA AAA TTT GGA GAA AGA	209
Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg	
GCT TTC AAA GCA TGG GCA GTA GCT CGC CTG AGC CAG AGA TTT CCC AAA GCT GAG TTT GCA	229
Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala	
GAA GTT TCC AAG TTA GTG ACA GAT CTT ACC AAA GTC CAC ACG GAA TGC TGC CAT GGA GAT	249
Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp	

Figure 2(a)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

CTG CTT GAA TGT GCT GAT GAC AGG GCG GAC CTT GCC AAG TAT ATC TGT GAA AAT CAA GAT Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp	269
TCG ATC TCC AGT AAA CTG AAG GAA TGC TGT GAA AAA CCT CTG TTG GAA AAA TCC CAC TGC Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys	289
ATT GCC GAA GTG GAA AAT GAT GAG ATG CCT GCT GAC TTG CCT TCA TTA GCT GCT GAT TTT Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe	309
GTT GAA AGT AAG GAT GTT TGC AAA AAC TAT GCT GAG GCA AAG GAT GTC TTC CTG GGC ATG Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met	329
TTT TTG TAT GAA TAT GCA AGA AGG CAT CCT GAT TAC TCT GTC GTA CTG CTG CTG AGA CTT Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu	349
GCC AAG ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAG TGC TGT GCC GCT GCA GAT CCT CAT GAA TGC Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys	369
TAT GCC AAA GTG TTC GAT GAA TTT AAA CCT CTT GTG GAA GAG CCT CAG AAT TTA ATC AAA Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys	389
CAA AAT TGT GAG CTT TTT GAG CAG CTT GGA GAG TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val	409
CGT TAC ACC AAG AAA GTA CCC CAA GTG TCA ACT CCA ACT CTT GTA GAG GTC TCA AGA AAC Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn	429
CTA GGA AAA GTG GGC AGC AAA TGT TGT AAA CAT CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC TGT GCA Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala	449
GAA GAC TAT CTA TCC GTG GTC CTG AAC CAG TTA TGT GTG TTG CAT GAG AAA ACG CCA GTA Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val	469
AGT GAC AGA GTC ACC AAA TGC TGC ACA GAA TCC TTG GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT TCA Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser	489
GCT CTG GAA GTC GAT GAA ACA TAC GTT CCC AAA GAG TTT AAT GCT GAA ACA TTC ACC TTC Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe	509
CAT GCA GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAG GAG AGA CAA ATC AAG AAA CAA ACT GCA CTT His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu	529
GTT GAG CTT GTG AAA CAC AAG CCC AAG GCA ACA AAA GAG CAA CTG AAA GCT GTT ATG GAT Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp	549
GAT TTC GCA GCT TTT GTA GAG AAG TGC TGC AAG GCT GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT GCC Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala	569
<div style="text-align: center;">MstII</div> GAG GAG GGT AAA AAA CTT GTT GCT GCA AGT CAA GCT GCC TTA GGC TTA (NNN)p TAA GCTT Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu (X)p *** PEPTIDE	

Figure 2(b)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

4/21

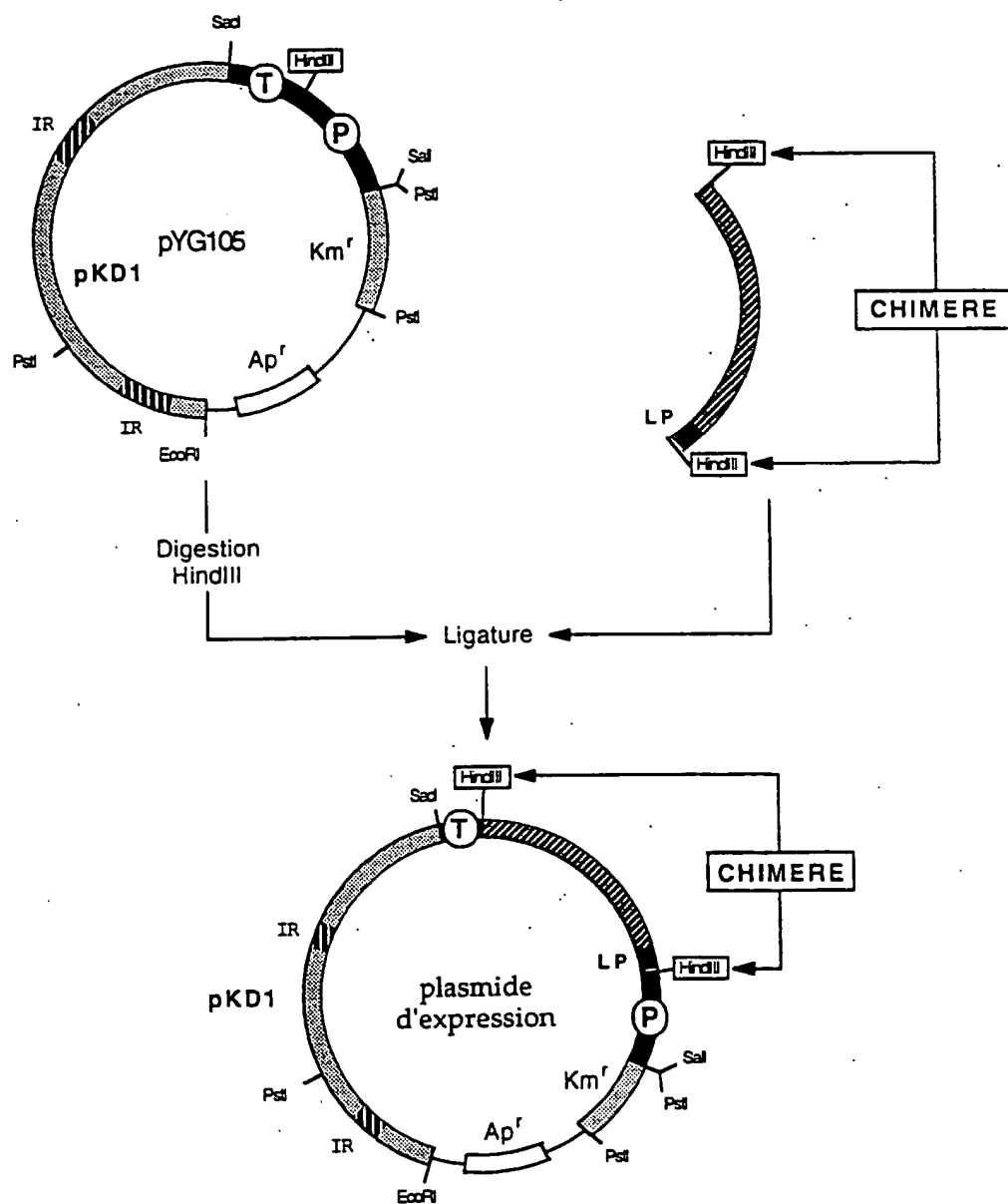


Figure 3

Figure 4A

CC TTA GGC TTA (NNN) 244 TAA GCTT
Leu Gly Leu (Thr470->Val713) ***

Figure 4B

CC TTA GGC TTA (NNN) 29 TAA GCTT
Leu Gly Leu (Thr470->Asp498) ***

Figure 4C

CC TTA GGC CTC (NNN) 14 TAA GCTT
Leu Gly Leu (Cys695->Pro708) ***
<----- D5 ----->

Figure 4D

CC TTA GGC TTA (NNN) 90 TAA GCTT
Leu Gly Leu (Thr470->Tyr508, Arg663->Val713) ***

Figure 4 (A à D)

SEQ ID NO: 2

CC TTA GGC TTA ACC TGT GAA GCC TGC CAG GAG CCG GGA GGC CTG GTG GTG CCT CCC ACA 601
 Leu Gly Leu Thr Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu Val Val Pro Pro Thr
 SAK<---I--->VNF470--713

GAT GCC CCG GTG AGC CCC ACC ACT CTG TAT GTG GAG GAC ATC TCG GAA CCG CCG TTG CAC 621
 Asp Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Val Glu Asp Ile Ser Glu Pro Pro Leu His

GAT TTC TAC TGC AGC AGG CTA CTG GAC CTG GTC TTC CTG CTG GAT GGC TCC TCC AGG CTG 641
 Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu Leu Asp Leu Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu

TCC GAG GCT GAG TTT GAA GTG CTG AAG GCC TTT GTG GTG GAC ATG ATG GAG CCG CTG CCG 661
 Ser Glu Ala Glu Phe Glu Val Leu Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu Arg

ATC TCC CAG AAG TCG GTC CCG GTG GCC GTG GTG GAG TAC CAC GAC GGC TCC CAC GCC TAC 681
 Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp Gly Ser His Ala Tyr

ATC GCG CTC AAG GAC CCG AAG CGA CCG TCA GAG CTG CCG CCG ATT GCC AGC CAG GTG AAG 701
 Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser Glu Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys

TAT GCG GGC AGC CAG GTG GCC TCC ACC AGC GAG GTC TTG AAA TAC ACA CTG TTC CAA ATC 721
 Tyr Ala Gly Ser Gln Val Ala Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile

TTC AGC AAG ATC GAC CCG CCT GAA GCC TCC CCG ATC GCC CTG CTC CTG ATG GCC AGC CAG 741
 Phe Ser Lys Ile Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Ala Leu Leu Leu Met Ala Ser Gln

GAG CCC CAA CCG ATG TCC CCG AAC TTT GTC CCG TAC GTC CAG GGC CTG AAG AAG AAG AAG 761
 Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe Val Arg Tyr Val Gln Gly Leu Lys Lys Lys Lys

GTC ATT GTG ATC CCG GTG GGC ATT GGG CCC CAT GCC AAC CTC AAG CAG ATC CCG CTC ATC 781
 Val Ile Val Ile Pro Val Gly Ile Gly Pro His Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile

GAG AAG CAG GCC CCT GAG AAC AAG GCC TTC GTG CTG AGC AGT GTG GAT GAG CTG GAG CAG 801
 Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val Asp Glu Leu Glu Gln

CAA AGG GAC GAG ATC GTT AGC TAC CTC TGT GAC CTT GCC CCT GAA GCC CCT CCT CCT ACT 821
 Gln Arg Asp Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro Thr

CTG CCC CCC GAC ATG GCA CAA GTC TAA GCTT 829
 Leu Pro Pro Asp Met Ala Gln Val ***

Figure 4 (E)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

7/21

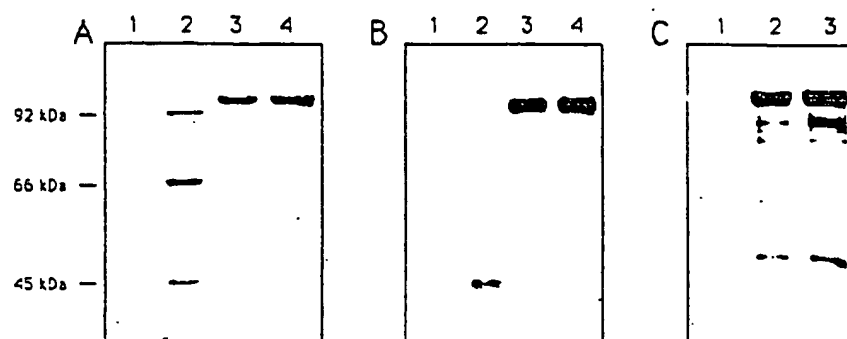


Figure 5

FEUILLE DE REMPLACEMENT

8/21

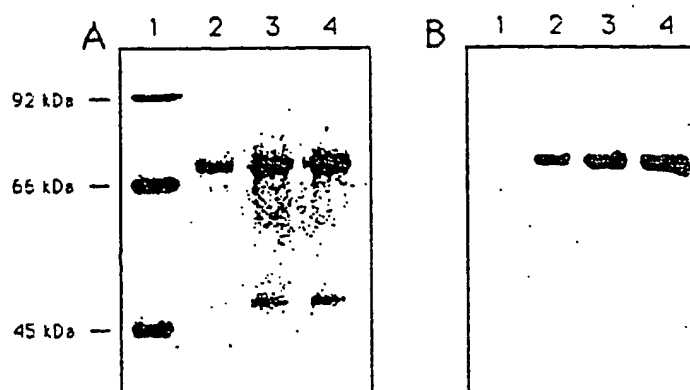


Figure 6

FEUILLE DE REMPLACEMENT

9/21

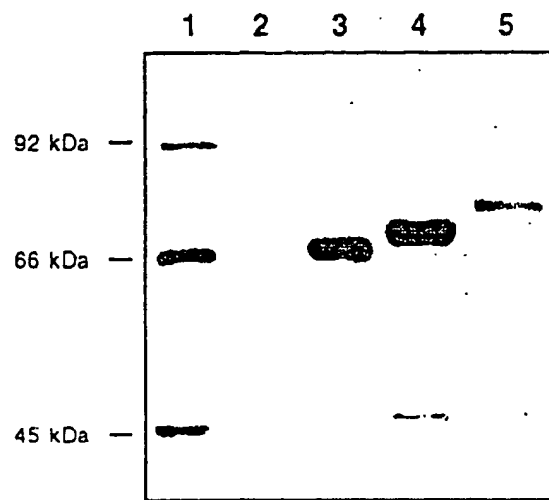


Figure 7

FEUILLE DE REMPLACEMENT

SEQ ID NO. 3

CC TTA GGC TTA AGC AAT GAA CTT CAT CAA GTT CCA TCG AAC TGT GAC TGT CTA AAT GGA
 Leu Gly Leu Ser Asn Glu Leu His Gln Val Pro Ser Asn Cys Asp Cys Leu Asn Gly 601
 SAH<---I--->UK
 GGA ACA TGT GTG TCC AAC AAG TAC TTC TCC AAC ATT CAC TGG TGC AAC TGC CCA AAG AAA
 Gly Thr Cys Val Ser Asn Lys Tyr Phe Ser Asn Ile His Trp Cys Asn Cys Pro Lys Lys 621
 TTC GGA GGG CAG CAC TGT GAA ATA GAT AAG TCA AAA ACC TGC TAT GAG GGG AAT GGT CAC
 Phe Gly Gly Gln His Cys Glu Ile Asp Lys Ser Lys Thr Cys Tyr Glu Gly Asn Gly His 641
 EGF-LIKE<---I--->KRINGLE
 TTT TAC CGA GGA AAG GCC AGC ACT GAC ACC ATG GGC CGG CCC TGC CTG CCC TGG AAC TCT
 Phe Tyr Arg Gly Lys Ala Ser Thr Asp Thr Met Gly Arg Pro Cys Leu Pro Trp Asn Ser 661
 GCC ACT GTC CTT CAG CAA ACG TAC CAT GCC CAC AGA TCT GAT GCT CTT CAG CTG GGC CTG
 Ala Thr Val Leu Gln Gln Thr Tyr His Ala His Arg Ser Asp Ala Leu Gln Leu Gly Leu 681
 GGG AAA CAT AAT TAC TGC AGG AAC CCA GAC AAC CGG AGG CGA CCC TGG TGC TAT GTG CAG
 Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Arg Arg Arg Pro Trp Cys Tyr Val Gln 701
 GTG GGC CTA AAG CCG CTT GTC CAA GAG TGC ATG GTG CAT GAC TGC GCA GAT GGA AAA TAA
 Val Gly Leu Lys Pro Leu Val Gln Glu Cys Met Val His Asp Cys Ala Asp Gly Lys ... 720
 OCTT

Figure 8

FEUILLE DE REMPLACEMENT

11/21

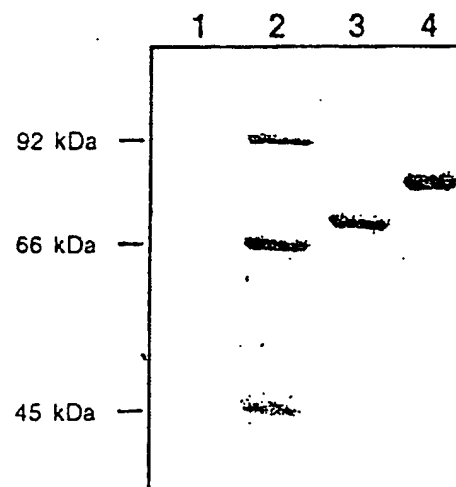


Figure 9

FEUILLE DE REMPLACEMENT

SEQ ID NO: 4

ApaI

CC TTA GCC TTA ACC CCC CTG GCC CCT GCC AGC TCC CTG CCC CAG AGC TTC CTG CTC AAG
 Leu Gly Leu Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys 601
 SAA<---I--->G-CSF

TGC TTA GAG CAA GTG AGG AAG ATC CAG GGC GAT GGC GCA GCG CTC CAG GAG AAG CTG TGT
 Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys Leu Cys 621

GCC ACC TAC AAG CTG TGC CAC CCC GAG GAG CTG GTG CTG CTC GGA CAC TCT CTG GCC ATC
 Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile 641

SstI

CCC TGG GCT CCC CTG AGC TCC TGC CCC AGC CAG GCC CTG CAG CTG GCA GGC TGC TTG AGC
 Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser 661

CAA CTC CAT AGC GGC CTT TTC CTC TAC CAG GGG CTC CTG CAG GCC CTG GAA GGG ATA TCC
 Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser 681

CCC GAG TTG GGT CCC ACC TTG GAC ACA CTG CAG CTG GAC GTC GCC GAC TTT GCC ACC ACC
 Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr 701

ATC TGG CAG CAG ATG GAA GAA CTG GGA ATG GCC CCT GCC CTG CAG CCC ACC CAG GGT GCC
 Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala 721

ATG CCG GCC TTC GCC TCT GCT TTC CAG CCC CGG GCA GGA GGG GTC CTG GTT GCT AGC CAT
 Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His 741

CTG CAG AGC TTC CTG GAG GTG TCG TAC CGC GTT CTA CGC CAC CTT GCG CAG CCC TGA AGCTT
 Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro ... 759

Figure 10

FEUILLE DE REMPLACEMENT

SEQ ID NO: 5

AAGCT TTACAACAAA TATAAAAACA ATG AAG TGG GTA ACC TTT ATT TCC CTT CTT TTT CTC TTT
 Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe -12
 AGC TCG GCT TAT TCC AGG GGT GTG TTT CGT CGA ACC CCC CTG GCC CCT GCC AGC TCC CTG
 Ser Ser Ala Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu 9
 CCC CAG AGC TTC CTG CTC AAG TGC TTA GAG CAA GTG AGG AAG ATC CAG GGC GAT GGC GCA
 Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala 29
 GCG CTC CAG GAG AAG CTG TGT GCC ACC TAC AAG CTG TGC CAC CCC GAG GAG CTG GTG CTG
 Ala Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu 49
 CTC GGA CAC TCT CTG GGC ATC CCC TGG GCT CCC CTG AGC TCC TGC CCC AGC CAG GCC CTG
 Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu 69
 CAG CTG GCA GGC TGC TTG AGC CAA CTC CAT AGC GGC CTT TTC CTC TAC CAG GGG CTC CTG
 Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu 89
 CAG GCC CTG GAA GGG ATA TCC CCC GAG TTG GGT CCC ACC TTG GAC ACA CTG CAG CTG GAC
 Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp 109
 GTC GCC GAC TTT GCC ACC ACC ATC TGG CAG CAG ATG GAA GAA CTG GGA ATG GCC CCT GCC
 Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala 129
 CTG CAG CCC ACC CAG GGT GCC ATG CCG GCC TTC GCC TCT GCT TTC CAG CGC CGG GCA GGA
 Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly 149
 GGG GTC CTG GTT GCT AGC CAT CTG CAG AGC TTC CTG GAG GTG TCG TAC CGC GTT CTA CGC
 Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg 169
 CAC CTT CGC CAG CCC GCT GGA GGC GGT GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT CAT CGG TTT
 His Leu Ala Gln Pro Gly Gly Gly Gly Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe 189
 G-CSF<---I linker I---->SAB
 AAA GAT TTG GGA GAA GAA AAT TTC AAA GCC TTG GTG TTG ATT GCC TTT GCT CAG TAT CTT
 Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu 209
 CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT CAT GTA AAA TTA GTG AAT GAA GTA ACT GAA TTT GCA AAA
 Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys 229
 ACA TGT GTT GCT GAT GAG TCA GCT GAA AAT TGT GAC AAA TCA CTT CAT ACC CTT TTT GGA
 Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly 249
 GAC AAA TTA TGC ACA GTT GCA ACT CTT CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC TGC TGT
 Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys 269
 GCA AAA CAA GAA CCT GAG AGA AAT GAA TGC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC CCA AAC
 Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn 289
 CTC CCC CGA TTG GTG AGA CCA GAG GTT GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT CAT GAC AAT GAA
 Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu 309
 GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT GAA ATT CCC AGA AGA CAT CCT TAC TTT TAT GCC
 Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala 329

Figure 11 (a)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

CCG GAA CTC CTT TTC TTT GCT AAA AGG TAT AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT TGC CAA GCT Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala	344
GCT GAT AAA GCT GCC TGC CTG TTG CCA AAG CTC GAT GAA CTT CGG GAT GAA GGG AAG GCT Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala	369
TGC TCT GCC AAA CAG AGA CTC AAG TGT GCC AGT CTC CAA AAA TTT GGA GAA AGA GCT TTC Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe	389
AAA GCA TGG GCA GTA GCT CGC CTG AGC CAG AGA TTT CCC AAA GCT GAG TTT GCA GAA GTT Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val	409
TCC AAG TTA GTG ACA GAT CTT ACC AAA GTC CAC ACG GAA TGC TGC CAT GGA GAT CTG CTT Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu	429
GAA TGT GCT GAT GAC AGG GCG GAC CTT GCC AAG TAT ATC TGT GAA AAT CAA GAT TCG ATC Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile	449
TCC AGT AAA CTG AAG GAA TGC TGT GAA AAA CCT CTG TTG GAA AAA TCC CAC TGC ATT GCC Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala	469
GAA GTG GAA AAT GAT GAG ATG CCT GCT GAC TTG CCT TCA TTA GCT GCT GAT TTT GTT GAA Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu	489
AGT AAG GAT GTT TGC AAA AAC TAT GCT GAG GCA AAG GAT GTC TTC CTG GGC ATG TTT TTG Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu	509
TAT GAA TAT GCA AGA AGG CAT CCT GAT TAC TCT GTC GTA CTG CTG CTG AGA CTT GCC AAG Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys	529
ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAG TGC TGT GCC GCT GCA GAT CCT CAT GAA TGC TAT GCC Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala	549
AAA GTG TTC GAT GAA TTT AAA CCT CTT GTG GAA GAG CCT CAG AAT TTA ATC AAA CAA AAT Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn	569
TGT GAG CTT TTT GAG CAG CTT GGA GAG TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT CGT TAC Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr	589
ACC AAG AAA GTA CCC CAA GTG TCA ACT CCA ACT CTT GTA GAG GTC TCA AGA AAC CTA GGA Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly	609
AAA GTG GGC AGC AAA TGT TGT AAA CAT CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC TGT GCA GAA GAC Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp	629
TAT CTA TCC GTG GTC CTG AAC CAG TTA TGT GTG TTG CAT GAG AAA ACG CCA GTA AGT GAC Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp	649
AGA GTC ACC AAA TGC TGC ACA GAA TCC TTG GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT TCA GCT CTG Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu	669
GAA GTC GAT GAA ACA TAC GTT CCC AAA GAG TTT AAT GCT GAA ACA TTC ACC TTC CAT GCA Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala	689
GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAG GAG AGA CAA ATC AAG AAA CAA ACT GCA CTT GTT GAG Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu	709
CTT GTG AAA CAC AAG CCC AAG GCA ACA AAA GAG CAA CTG AAA GCT GTT ATG GAT GAT TTC Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe	729
GCA GCT TTT GTA GAG AAG TGC TGC AAG GCT GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT GCC GAG GAG Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu	749
GGT AAA AAA CTT GTT GCT GCA AGT CAA GCT <u>GCC TTA GGC</u> TTA TAA CATCACATTT Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu ***	763
MetII	
AAAAGCATCT CAGCCTACCA TGAGAATAAG AGAAAGAAAA TGAAGATCAA AAGCTT	

Figure 11 (b)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

15/21

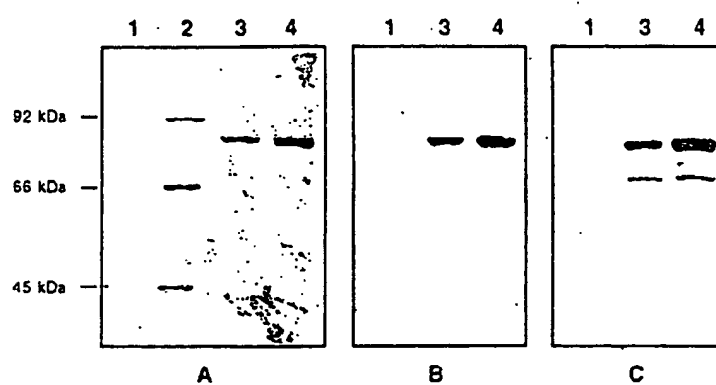


Figure 12

FEUILLE DE REMPLACEMENT

16/21

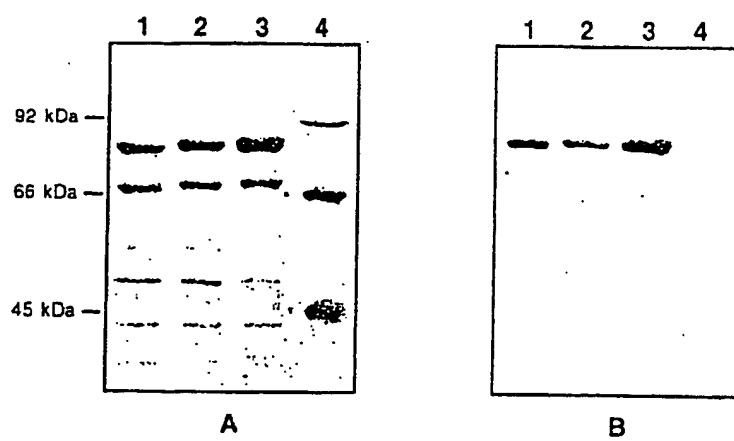


Figure 13

FEUILLE DE REMPLACEMENT

SEQ.ID NO: 6

CC TTA GGC TTA CAG GTG CAG CTC GAG CAG TCT GGA CCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG GCC 601
 Leu Gly Leu Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 SAH<---I--->VH

TCA GTG AAG ATT TCC TGC AAA GCT TCT GGC TAC GCA TTC AGT AGG TCT TGG ATG AAC TGG 621
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Arg Ser Trp Met Asn Trp

GTG AAG CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTT GAG TGG ATT GGA CGG ATT TAT CCT GGA GAT GGA 641
 Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly

GAT ACC AAA TAC AAT GGG AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCG GAC AGA TCA TCC 661
 Asp Thr Lys Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Ser

AGC ACA GCC TAC ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACC TCT GTG GGC TCT GCG GTC TAT TTC TGT 681
 Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Gly Ser Ala Val Tyr Phe Cys

GCA AAA GAG AAC AAT AGG TTC GAC GAG AGG GGT TAC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGC CAA 701
 Ala Lys Glu Asn Asn Arg Phe Asp Glu Arg Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGC GGT GGC TCG GGC GGT GGT GGG TCG GGT GGC 721
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 VH<---I linker synthétique

GGC GGA TCT AAC ATT CAG TTG ACC CAG TCT CCA AAT TCC ATG TCC ACA TCA GTA GGA GAC 741
Gly Gly Ser Asn Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Asn Ser Met Ser Thr Ser Val Gly Asp
 I--->VL

AGG GTC AGC ATC ACC TGC AAG GCC AGT CAG GAT GTG GAT ACT TCT GTA GCC TGG TAT CAA 761
 Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asp Thr Ser Val Ala Trp Tyr Gln

CAG AAA CCA GGG CAA TCT CCT AAA CTA CTG ATT TAC TGG GCA TCC ACC CGG CAC ACT GGA 781
 Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly

GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATT AGC AAT 801
 Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn

GTG CAG TCT GAA GAC TCG GCA GAT TAT TTC TGT CAG CAA TAT AGC AGC TAT CCG TGG ACG 821
 Val Gln Ser Glu Asp Ser Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Trp Thr

TTC GGT GGA GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA TAA GCTT 831
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys ***

Figure 14

18/21

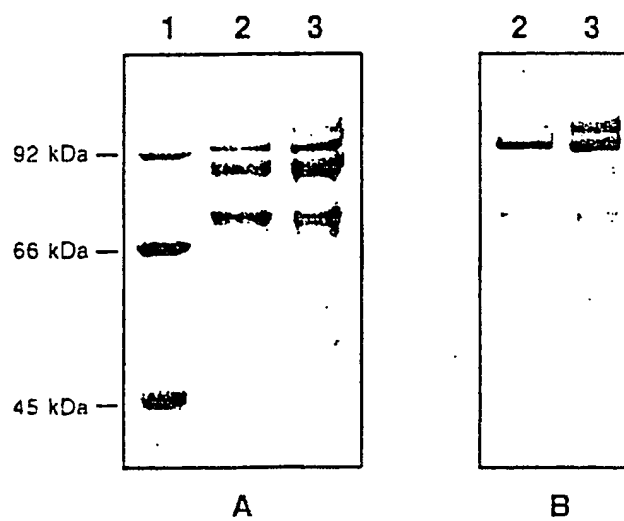


Figure 15

FEUILLE DE REMPLACEMENT

19/21

PRODUIT	CI ₅₀ (nM)
RG12986	50
SAH-vWF ₆₉₄₋₇₀₈	50000
SAH-vWF ₄₇₀₋₇₁₃ C471,474->G	20
SAH-vWF ₄₇₀₋₇₀₄ C471,474->G	<10

Figure 16

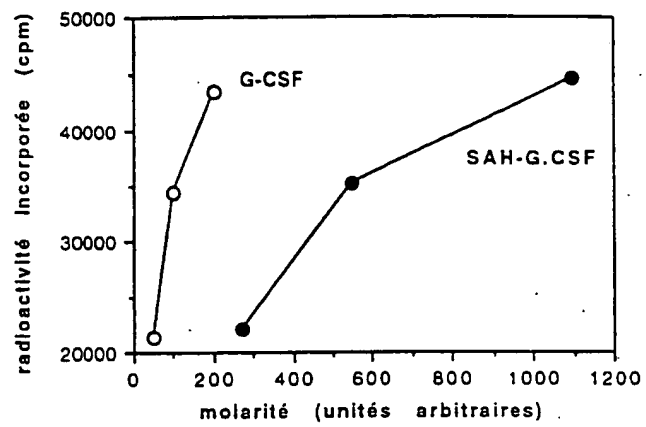


Figure 17

21/21

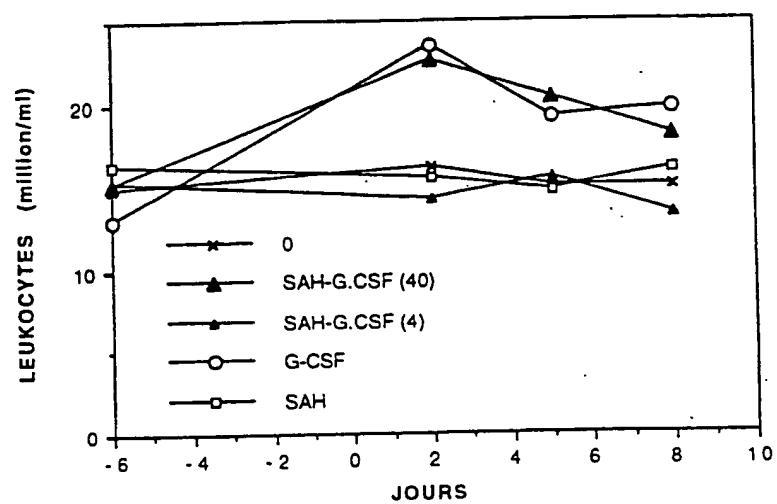


Figure 18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR93/00085

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl. ⁵ : C12N 15/12; C12N 15/62; C12N 15/81; C12P 21/02 C07K 13/00; A61K 37/02; C12N 1/19; //(C12N 1/19, R1:85). According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. Cl. ⁵ : C12N; C12P, C07K; A61K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, A, 9 013 653 (DELTA BIOTECHNOLOGY LIMITED) 15 November 1990, see page 11, paragraph 3 - page 12, paragraph 2; claims 1-7	1-5,7,9-18
X	WO, A, 8 902 922 (GENENTECH, INC.) 6 April 1989, see claims 1,2,5,8,12,17 see claims 24,25,41,44	1,2,5,6,9,10, 17,18
X	EP, A, 0 413 622 (RHONE-POULENC SANTE) 20 February 1991, see claims 1-29	1,2,5,7-18
Y	DATABASE WPIL Section Ch, Week 9141, Derwent Publications Ltd., London, GB; Class C, AN 91-300976 & JP, A, 3 201 987 (TONEN CORP) 3 September 1991, see abstract	1-19
P,Y	WO, A, 9 300 437 (RHONE-POULENC RORER S.A.) 7 January 1993, see claims 25,26; figures 14,15	1-19
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 June 1993 (18.06.93)		Date of mailing of the international search report 2 July 1993 (02.07.93)
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9300085
SA 70239

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

18/06/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9013653	15-11-90	AU-B- 630450	29-10-92
		AU-A- 5564690	29-11-90
		EP-A- 0470165	12-02-92
		GB-A, B 2246783	12-02-92
		JP-T- 4506598	19-11-92
WO-A-8902922	06-04-89	None	
EP-A-0413622	20-02-91	FR-A- 2650598	08-02-91
		CA-A- 2022539	04-02-91
		JP-A- 3178998	02-08-91
WO-A-9300437	07-01-93	FR-A- 2677996	24-12-92
		AU-A- 2148192	25-01-93
		EP-A- 0519829	23-12-92

EPO FORM PCT

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.